

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität
München

Analyse der Migration von Thrombozyten *in vivo*

von Gerhild Romana Rosenberger
aus St. Andrä im Lungau

München 2017

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Angefertigt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Klinikums der
Universität München

Mentor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Korreferent: PD Dr. Christina Hölzel
Prof. Dr. Cornelia Deeg

Tag der Promotion: 11. Februar 2017

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	8
II.	LITERATURÜBERSICHT	9
1.	Thrombozyten.....	9
1.1.	Ursprung und Morphologie der Thrombozyten.....	9
1.2.	Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Thrombozyten	10
2.	Migration von Zellen	15
2.1.	Relevanz der Zellmigration.....	15
2.1.	Migrationsablauf einer Zelle und Aufbau des Zytoskeletts.....	16
3.	Migration von Thrombozyten	18
3.1.	MYH9-abhängige Migration.....	20
3.2.	α IIb β 3-Integrin-abhängige Migration	21
4.	Inflammation und Sepsis	22
4.1.	Die Leber als wichtiges Organ in der Immunabwehr.....	23
4.2.	Zelluläre Komponenten der Inflammation	24
III.	ZIELSETZUNG	26
IV.	MATERIAL UND METHODEN.....	27
1.	Versuchstiere.....	27
1.1.	Wildtypstamm C57BL/6J	27
1.2.	Rosa26mT/mGxPf4Cre	28
1.3.	CD41-YFP	28
1.4.	MYH9 defiziente Mäuse	28
2.	Tierhaltung und Hygienemanagement	31
3.	Anästhesie	33
3.1.	Durchführung der Narkose	34
3.2.	Narkosemanagement und -überwachung	34
4.	Intravenöse Applikation.....	35
4.1.	Schwanzvenenkatheter	35
4.2.	Femoraliskatheter.....	36

5.	Blutentnahmemethoden	36
5.1.	Intrakardiale Blutentnahme	36
5.2.	Blutentnahme über <i>Vena facialis</i>	37
6.	Intravitalmikroskopie (IVM)	38
6.1.	Fluoreszenz	38
6.2.	2-Photonen-Mikroskopie	39
6.3.	Epifluoreszenzmikroskopie.....	40
6.4.	Modelle zur Intravitalmikroskopie	41
7.	Sepsis-Modell	45
7.1.	Anzucht von Bakterien	48
7.2.	CFUs (Colony Forming Units)	49
7.3.	Agar-Platten	50
7.4.	Bestimmung von IL-6 und ALT/AST im Plasma	50
8.	Immunhistologie.....	52
8.1.	Anfertigung histologischer Schnitte	53
8.2.	Immunhistologische Färbung	53
8.3.	Aufnahmen der histologischen Immunofluoreszenz-Schnitte	58
8.4.	Auswertung	59
9.	Statistische Messverfahren.....	60
V.	ERGEBNISSE	61
1.	Ohrmodell	61
2.	Cremastermodell	63
2.1.	Interaktion von Thrombozyten mit Fibrin(ogen).....	63
2.2.	Interaktion von Thrombozyten mit <i>E. coli</i> -Partikeln	64
3.	Leber-Modell	65
4.	Sepsis-Modell	68
4.1.	CFUs	69
4.2.	Fibrin(ogen)-Deposition	69
4.3.	Thrombozytenanzahl.....	71
4.4.	Bakterienanzahl.....	75
4.5.	Kolokalisationen von Thrombozyten mit Bakterien	76
4.6.	4h-Zeitpunkt	79

4.7.	Klinisches Bild der Tiere	83
4.8.	Untersuchung der Zytokine und Leberenzyme	84
VI.	DISKUSSION	88
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	100
VIII.	SUMMARY	102
IX.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	104
X.	TABELLENVERZEICHNIS	106
XI.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	107
XII.	LITERATURVERZEICHNIS	109
XIII.	DANKSAGUNG	125

I. EINLEITUNG

Die wohl wichtigste Rolle der Thrombozyten im adulten Organismus ist die Funktion als zellulärer Teil in der Hämostase und Thrombus-Bildung (1-3). Eine große Anzahl an dicht aneinander geordneten, sich in einem festen Fasernetz aus Fibrin(ogen) befindlichen Thrombozyten bilden einen stabilen Thrombus, der unter den Scherkräften des Blutflusses bestehen kann. Gerade wegen des engen Verbundes innerhalb des Thrombus und ihrer kleinen Größe, gestaltet es sich als äußerst schwierig, mikroskopische Untersuchungen, insbesondere im lebenden Organismus, an dieser Zellpopulation durchzuführen. Aus diesem Grund ist wenig über das Verhalten der einzelnen Thrombozyten bekannt.

Die Funktion der Thrombozyten ragt jedoch weit über die der Hämostase hinaus. Schon in der Entwicklung des Individuums, der Embryogenese, spielen Thrombozyten eine wichtige Rolle (4). Neben einer Beteiligung in der Tumorgenese (5) sowie Metastasierung (6) rücken sie zunehmend in den Fokus als wichtige Komponente der Inflammation und Immunantwort (3, 7-11). So wurde sogar die Behauptung aufgestellt, dass sie dabei eine ähnlich wichtige Rolle einnehmen wie die in der Hämostase (12).

Bisher galten die aus dem Blutstrom rekrutierten Thrombozyten als unbewegliche Zellen. Jedoch verfügt diese Zellpopulation über alle molekularen Bestandteile, welche eine selbstständige Wanderung ermöglichen (13). Zwar wurden seit den 1970er Jahren Thrombozyten als Zellen mit potentieller Fähigkeit zur Migration dargestellt (14-19), dennoch konnte die Zellmigration bisher *in vivo* nicht belegt werden. Unserer Arbeitsgruppe ist es kürzlich gelungen, erstmals die Migration einzelner Thrombozyten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mikroskopisch darzustellen und die zellbiologischen Mechanismen der Thrombozytenmigration zu charakterisieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, das Vorkommen der Thrombozytenmigration *in vivo* weiter zu verfolgen sowie die Rolle und Relevanz der Migration von Thrombozyten im lebenden Organismus darzustellen und weiter aufzuklären.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Thrombozyten

1.1. Ursprung und Morphologie der Thrombozyten

Thrombozyten sind Zellen von diskoider Form mit einem Durchmesser von 1-3 μm und somit die kleinsten Blutzellen im Körper. Durch Abschnürungen der Megakaryozyten werden sie in die Blutbahn abgegeben. Dabei entlässt ein einziger Megakaryozyt tausende an Thrombozyten in die Zirkulation (20, 21). Reguliert wird die Freisetzung der Thrombozyten in die Blutbahn unter anderem durch Thrombopoietin (22). Im menschlichen Körper zirkulieren $150 - 400 \times 10^9$ Thrombozyten, mit einer Halbwertszeit von 8 bis 10 Tagen. Bei der Maus liegt die Thrombozytenzahl bei $900 - 1600 \times 10^9$ Thrombozyten pro Liter Blut (23).

Thrombozyten sind kernlose Zellfragmente und besitzen somit keine DNA, jedoch sind sie im Besitz von messenger RNA (mRNA) und können somit verschiedene Proteine *de novo* synthetisieren (24).

Dennoch erhalten sie den Großteil ihrer Zellbestandteile und ihres Proteoms direkt von Megakaryozyten, wie z. B. eine Vielzahl von Adhäsionsmolekülen. Eine besondere Rolle spielen hierbei Integrine. Integrine sind transmembranöse Adhäsionsrezeptoren, die sich jeweils aus einer α - und β -Untereinheit zusammensetzen und eine funktionelle Einheit bilden. Sie vermitteln unter anderen die Bindung des Zytoskeletts an extrazelluläre Matrix, aber auch die Interaktion mit anderen Zellen (25).

Zu den Integrinen der Thrombozyten zählt auch der Oberflächenrezeptor GPIIb-IIIa, auch bekannt als $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin. Im nicht-aktivierten Zustand der Thrombozyten befindet sich der Großteil des $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrins in einem geringaffinen Funktionsstadium auf der Plasmamembran.

Das $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin spielt eine wichtige Rolle in der Aggregation von Thrombozyten (26). Fehlt es, beziehungsweise weist es eine Dysfunktion in Folge einer Anomalität des Integrins auf, führt dies zu einem Blutungssyndrom, welches als Glanzmann Thrombasthenie ausführlich in

der Humanmedizin charakterisiert wurde (27, 28), aber auch bei Hunden (29-31), und Pferden (32) beschrieben ist.

Während der Aktivierung setzen Thrombozyten eine Vielzahl von Granula frei. Man unterscheidet drei Arten von Granula:

(1) Sogenannte elektronendichte Granulae („dense granule“), in denen verschiedene Substanzen wie ADP, ATP, Serotonin, Ca^{2+} gespeichert sind. Diese Stoffe sind bei der Aggregation, Vasokonstriktion und Produktion von proinflammatorischen Zytokinen beteiligt (33).

(2) α -Granula enthalten vor allem höher molekulare Polypeptide, die nach Aktivierung der Thrombozyten schnell freigesetzt werden können, und lokal die Prozesse der Hämostase und Entzündungsantwort unterstützen. Zum einen enthalten sie Plasmaproteine wie Fibrin(ogen), Fibronektin und von Willebrand Faktor, die für die Thrombozytenfunktion von Bedeutung sind. Aber auch Gerinnungsfaktoren und deren Cofaktoren sowie Inhibitoren befinden sich in den alpha-Granula, wodurch die Thrombozyten Einfluss auf die sekundäre Hämostase haben (34).

(3) Außerdem enthalten Thrombozyten lysosomale Granula welche antimikrobiellen Charakter aufweisen (35). Sie enthalten verschiedene Enzyme wie Proteasen und Glykosidasen und unterstützen somit die Eliminierung von Pathogenen.

1.2. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Thrombozyten

1.2.1. Hämostase

Die wichtigste physiologische Rolle der Thrombozyten ist die Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität und die Hämostase, die den Körper vor übermäßigen Blutverlusten bewahrt (3). Hunderte Milliarden an Thrombozyten zirkulieren in der Blutbahn und prüfen das Gefäßendothel fortwährend auf Intaktheit. Unter normalen Bedingungen setzt das Endothel der Gefäße Prostazyklin und Stickstoff (NO) frei, was eine Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten verhindert (36). Kommt es zur Verletzung oder Inflammation des Endothels, werden umgehend Thrombozyten rekrutiert (37). Dieser erste Kontakt mit dem Gefäßendothel

wird als „Tethering“ bezeichnet. Die Thrombozyten binden direkt mit den an ihrer Membran befindlichen Glykoproteinrezeptoren Ia/IIa (Integrin $\alpha_2\beta_1$) und GPVI an das freiliegende Kollagen (38). Unter hohen Flussbedingungen bildet der von Willebrand Faktor eine Brücke zwischen Kollagenfasern und dem an der Thrombozytenoberfläche befindlichen GP (Glykoprotein) Ib/V/IX-Komplex (39).

Nach initialem Entlangrollen an der Gefäßwand, dem sogenannten „Rolling“, gehen die Thrombozyten mit freiliegenden subendothelialen Komponenten eine Bindung ein und werden so an dem Gefäßendothel beziehungsweise der subendothelialen Matrix adhärent (40). In Folge der stabilen GPVI-abhängigen Bindung an Kollagen kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten und Freisetzung von Mediatoren aus dem Interzellularraum. Unter anderem wird aus den „dense granule“ ADP freigesetzt, welches auf den P_2Y_1 und P_2Y_{12} Glycoprotein-gekoppelten Rezeptor wirkt und für eine weitere Aktivierung sorgt (41). Das Ziel der freigesetzten Agonisten ist letztendlich die Aktivierung des Fibrin(ogen) bindenden GP IIb/IIIa-Rezeptors (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_{III}$). Durch die Mediatoren wie z. B. ADP, Serotonin und Thrombin werden die Thrombozyten außerdem weiter aktiviert, was zu einer Reorganisation des Zytoskeletts zur Folge hat (33). Morphologisch führt dies zu einer Formänderung der Thrombozyten, wobei sie zuerst abrunden, dann Zellfortsätze bilden, sogenannte Filopodien, um schließlich flache Membranlamellen, sogenannte Lamellipodien, auszubilden, die eine großflächige Abdeckung der Läsion gewährleisten. Diese Formveränderung ist mit der Aktivierung weiterer Integrine assoziiert, die schließlich für eine feste Adhäsion verantwortlich sind (42).

Parallel zur Rekrutierung der Thrombozyten läuft die Koagulationskaskade ab (43). Das wiederum veranlasst die Rekrutierung von weiteren Thrombozyten (44). Thrombozyten können dabei sogar eine Plattform für die Koagulationsprozesse bilden. So sekretieren und binden Thrombozyten eigenständig das Plasmamolekül Fibrin(ogen), welches über den GPIIb/IIIa-Rezeptor eine Brücke zwischen aggregierenden Thrombozyten bilden kann. Durch die Aktivierung verschiedener Koagulationsfaktoren fördern Thrombozyten zusätzlich die Bildung von Thrombin, welches zur

Bildung von Fibrin führt. Durch Fibrin kommt es zu Querverbindungen zwischen den Thrombozyten. Die Retraktion des Fibrinnetzwerkes durch die aktivierten Thrombozyten verhindert ein Fragmentieren beziehungsweise Abspülen in die Blutbahn und führt so zur Entstehung eines stabilen Thrombus (45, 46).

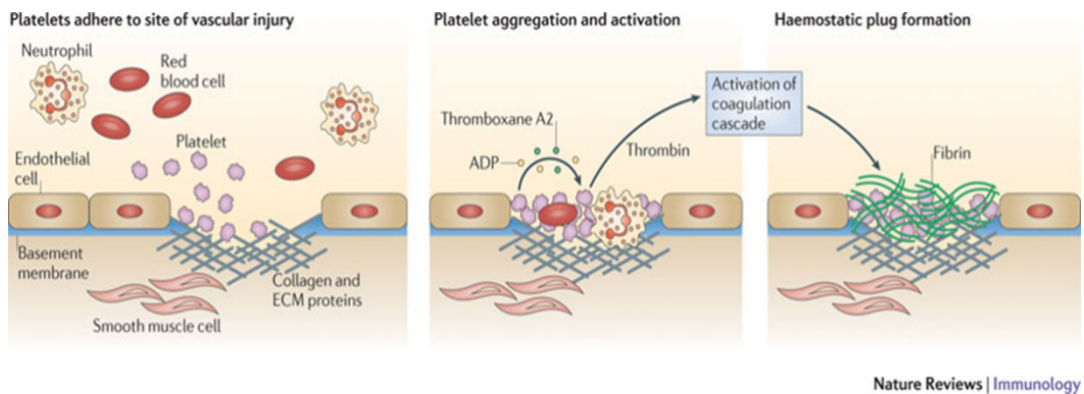


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hämostase

Links: die initiale Antwort der Thrombozyten nach Gefäßverletzung ist die Adhäsion über ihren GPIIb/IIIa-Rezeptor an Kollagenfasern und vWF der durch die Verletzung exponierten subendothelialen Matrix.

Mitte: Die adhärenenten Thrombozyten verändern ihre Form und setzen die Inhalte ihrer Granula frei. Diese enthalten unter anderem hohe Konzentrationen an Mediatoren wie ADP oder Thromboxan A₂, welche essentiell für die Aggregation und zusätzliche Rekrutierung von Thrombozyten sind.

Rechts: die Thrombozyten triggern außerdem die Koagulationskaskade, welche über Thrombin zur Bildung von Fibrin führt und somit schlussendlich für die Bildung eines stabilen Thrombus sorgt.

mit freundlicher Genehmigung von „Nature Publishing Group“, Nature Reviews Immunology; Semple et al (7), Copyright (2011)

1.2.2. Embryogenese

Jedoch haben Thrombozyten nicht nur in der Hämostase eine wichtige Funktion. Bereits in der Embryogenese nehmen sie eine wichtige Rolle in der Lymphangiogenese des Embryos ein (4). Durch die Expression von zwei Proteinen beeinflussen Thrombozyten die Migration und intrazelluläre Adhäsion von lymphatischen endothelialen Zellen, die für die Entstehung und Ausbildung der Lymphgefäße essentiell sind. Bei den beiden Proteinen handelt es sich um den Rezeptor CLEC-2 (C-type Lectin Rezeptor) und das für dessen Funktion essentielle Enzym Syk (Tyrosin Kinase). Fehlt Thrombozyten dieser wichtige Rezeptor, so kommt es zu einer Fehlentwicklung von Lymphgefäßen sowie Gefäßen des Gehirns, was in einer perinatalen Letalität resultiert (4).

1.2.3. Atherosklerose

Neben der wichtigen Rolle in der Bildung des Thrombus während der Hämostase sind Thrombozyten auch an einer Reihe anderer pathologischer Prozesse beteiligt. Dabei spielen sie eine große Rolle im Rahmen der Atherosklerose.

Hierbei handelt es sich um eine systemische inflammatorische Erkrankung, die durch die Akkumulation von Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten in der Intima großer Arterien mit Beteiligung von Thrombozyten charakterisiert ist (47, 48). Letztendlich führt dieser Prozess zur Ausbildung von komplexen atherosklerotischen Läsionen, die unter bestimmten Bedingungen rupturieren und die Ausbildung eines Thrombus zur Folge haben können.

Thrombozyten sind in diesem Prozess frühzeitig involviert. So erfolgt eine Adhäsion von Thrombozyten lange bevor es überhaupt zu ersten Anzeichen von atherosklerotischen Läsionen kommt (49). Im weiteren Verlauf der Genese der erosiven Läsion sind Thrombozyten auch maßgeblich beteiligt. Durch das Adhärieren an die atherosklerotische Gefäßwand werden die Thrombozyten aktiviert und setzen bioaktive Stoffe wie proinflammatorische Zytokine und Chemoattraktanten, wie IL-1 oder RANTES, frei (50, 51). Außerdem kommt es zur Expression von CD40L an der Oberfläche der Thrombozyten. Das führt zu einer Expression von Chemokinen und weiteren Adhäsionsmolekülen seitens der Endothelzellen, wodurch es zu einer Rekrutierung von Leukozyten kommt (52). Dabei werden in den arteriellen Gefäßen insbesondere Lymphozyten und Monozyten rekrutiert (53). Zusätzlich stimulieren Thrombozyten Leukozyten zur Expression und Sekretion von Zytokinen und fördern dadurch die Freisetzung oxidierender Substanzen von neutrophilen Granulozyten (54). Des Weiteren werden aus den α -Granula der Thrombozyten verschiedene Wachstumsfaktoren frei gesetzt, unter anderem Platelet-derived growth factor (PDGF) und Transforming growth factor- β (TGF- β) (55), welche das Wachstum und die Migration glatter Muskelzellen anregen (53).

1.2.4. Tumorgenese und Metastasierung

In neueren Arbeiten wird auch die Relevanz von Thrombozyten in tumorösen Geschehen aufgezeigt (5, 6). So wurde in zahlreichen Publikationen eine Beteiligung von verschiedenen Oberflächenmolekülen von Thrombozyten in der Metastasierung von Tumorzellen gezeigt (6).

1.2.5. Inflammation

1.2.5.1. Interaktion von Thrombozyten mit Pathogenen

Die sofortige Verfügbarkeit und unmittelbare Aktivität der Thrombozyten sobald die Integrität der Gefäßwände angegriffen ist, macht die Thrombozyten zu idealen Kandidaten in der ersten Abwehr von Pathogenen. Dabei reagieren Thrombozyten nicht nur auf pro-inflammatorische Mediatoren, welche im Rahmen einer mikrobiellen Invasion ausgeschüttet werden (56), sondern können auch direkt durch mikrobielle Bestandteile, wie Lipopolysaccharide (LPS) Gram-negativer Bakterien, stimuliert werden (57-59). Zudem ist bekannt, dass Thrombozyten auf unterschiedliche Weise mit Gram-positiven Bakterien, wie einigen Streptokokken und Staphylokokken-Spezies, interagieren (60-65).

Diese Interaktion kann direkt oder indirekt erfolgen. Bakterien wie *Streptococcus pyogenes* binden z. B. an Fibrin(ogen). Über Fibrin(ogen) kann wiederum eine Bindung über GPIIb/IIIa Rezeptoren (α IIb β 3-Integrin) der Thrombozyten erfolgen, die auf diese Weise aktiviert werden und Thromben um die Bakterien bilden. Durch die aktivierten Thrombozyten kommt es wiederum zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten (60). Eine Interaktion zwischen Bakterien und Thrombozyten kann aber auch direkt erfolgen. *Streptococcusepidermidis* kann eine direkte Bindung mit dem GPIIb/IIIa-Rezeptor eingehen und dadurch die Thrombozyten aktivieren (65). So ist auch von weiteren Streptokokken bekannt, dass sie direkt an den GPIb α -Rezeptor der Thrombozyten binden können (61).

An diesen Rezeptor (GPIb α) vermag auch *Staphylococcus aureus* über den von Willebrand Faktor an Thrombozyten zu binden und diese zu aktivieren (62). Auch von weiteren Spezies wie *Streptococcus sanguinis*

ist bekannt, dass sie zur Aggregation von Thrombozyten führen können und die Freisetzung ihrer Granula bewirken (63, 64). Diese Granula enthalten verschiedene Zytokine, die vor allem die Funktion der Leukozyten beeinflussen und proinflammatorische Effekte hervorrufen (34, 66).

Ähnlich wie Monozyten und Neutrophile, die die Fähigkeit besitzen, Bakterien zu phagozytieren, haben auch Thrombozyten Phagozytose-ähnliche Fähigkeiten. Dabei ist das OCS (open canicularsystem), ein gewundenes System an Kanälchen, welches mit der Zelloberfläche verbunden ist, beteiligt. Das OCS sowie die Oberflächenmembran der Thrombozyten entstehen durch die Abschnürung des Membransystems der Megakaryozyten (67-69). Diese Kanälchen dienen als Transportweg zur Freisetzung von endogenen Produkten aus den Granula (70, 71). Aber es können auch exogene niedermolekulare Proteine Partikel über das OCS aufgenommen werden (69, 72, 73). Dieses System ist auch an der Bindung von Bakterien beteiligt. Anders als Leukozyten, die Bakterien in ihren phagozytären Vakuolen einschließen (74), breiten sich Thrombozyten über den Bakterien aus, und nehmen diese teilweise in ihr OCS auf (75). Im Gegensatz zur Phagozytose befinden sich die Bakterien somit nicht im Intrazellularraum der Thrombozyten.

2. Migration von Zellen

2.1. Relevanz der Zellmigration

Die Migration ist ein fundamentaler Prozess vieler Lebewesen und ist sowohl bei Einzellern, wie Amöben, als auch im Organismus von Vielzellern, wie Säugetieren, von großer Bedeutung (76). Schon in den frühesten Stadien der Entstehung des Individuums, der Befruchtung, migriert das Spermium zur Eizelle (77, 78). Auch in der Embryogenese spielt sie eine herausragende Bedeutung in der Entstehung des Organismus. So ist die Zellmigration ein essentieller Vorgang in der Gastrulation (79, 80), Entstehung der Keimbahn (81) sowie der Ausbildung des Nervensystems (82). Des Weiteren ist die Migration von großer Relevanz im adulten Organismus. Nicht nur in physiologischen Prozessen wie der Einwanderung von Immunzellen in entzündetes

Gewebe (83) oder in der Wundheilung (84), sondern auch in pathologischen Prozessen wie Inflammation (85) und Metastasierung (86, 87) ist die Migration verschiedener Zellen in Eukaryoten involviert.

2.1. Migrationsablauf einer Zelle und Aufbau des Zytoskeletts

Die Migration von Zellen umfasst einen repetitiven Zyklus aus vier aufeinanderfolgenden Schritten (88). Die Voraussetzung zur Migration ist die Polarisierung der Zelle. Dabei müssen unterschiedliche molekulare Prozesse im Bereich des vorderen und hinteren Ende der Zelle ablaufen. Zu Beginn der Migration bilden die Zellen am vorderen Ende Membranprotrusionen in Richtung der Migration aus und heften sich über Adhäsionsrezeptoren an dem Substrat fest. In der Folge kommt es zur Kontraktion des Zytoplasmas und zur Lösung der Adhäsionsrezeptoren vom Substrat (88). Dabei unterscheidet man morphologisch an der migrierenden Zelle die am vorderen Ende der Zelle ausgestülpten Lamellipodien, „Leading Edge“, und den folgenden Zellkörper, „Trailing Edge“.

Die Protrusion der Zelle am vorderen Ende kommt durch die Polymerisation von Aktin zustande. Dabei entsteht ein verzweigtes Netzwerk aus Aktinfilamenten (89). Die großen breiten Protrusionen bezeichnet man dabei als Lamellipodien, die kleinen, spitzen als Filopodien. Die Polymerisation des Aktinnetzwerkes in Lamellipodien wird durch den Protein-Komplex Arp2/3 vermittelt. Arp2/3 führt dazu, dass an einem bestehenden Aktinfilament ein weiteres gebildet werden kann, das in einem Winkel von 70° vom initialen Filament abzweigt. Hierdurch entsteht schließlich ein Maschenwerk aus Aktin (90, 91). Dieses sich im Aufbau und Abbau befindliche Maschenwerk aus Aktinfilamenten ist in den meisten motilen eukaryotischen Zellen für die aktive Veränderung der Form und Generierung der Kräfte zur Fortbewegung essenziell (89, 90).

Neben der Ausbildung dynamischer Aktinfilamente ist die Kontraktion innerhalb der Zelle für eine effiziente Zellmigration von großer Bedeutung (92). Dabei ist das Motorprotein Myosin IIa eine wichtige Komponente. Myosin IIa sorgt initial für die Polarisierung der Zelle und während der

Migration für die Retraktion des Zellkörpers und Lösen der Adhäsionen im hinteren Bereich (93).

Myosin bildet bipolare Filamente, bestehend aus 14-20 Molekülen, deren Kopf-Domänen mit Aktinfilamenten interagieren können (94). Myosin IIa wird in antiparallele Bündel von Aktinfilamenten inkorporiert (95). Es kann sowohl Aktinfilamente binden und bündeln als auch diese gegeneinander verschieben, wodurch die Kontraktion der Filamente entsteht.

Die Aktivität des Myosins hängt von der Phosphorylierung der Myosin Light Chain (pMLC), welche durch die Kalzium-abhängige Myosin light chain kinase (MLCK)(96) und die Rho-Kinasen (ROCKs) reguliert wird, ab. ROCKs und MLCK agieren in enger Zusammenarbeit um die verschiedenen Momente der Zellkontraktilität zu regulieren (97).

Man unterscheidet zwischen gerichteter und ungerichteter Zell-Migration. Während die Zellen in der ungerichteten Migration zufällig in eine Richtung wandern, wird die Richtung in der gerichteten Migration durch verschiedene extrazelluläre Signale geleitet. Hierbei können folgende Arten der gerichteten Migration unterschieden werden: Die Haptotaxis, bei der Zellen in Antwort auf Oberflächen-gebundene Reize migrieren, die Chemotaxis, bei der die Migration in Richtung gelöster Reize erfolgt und die Durotaxis, bei der mechanische Reize die Richtung der Migration vorgeben (98).

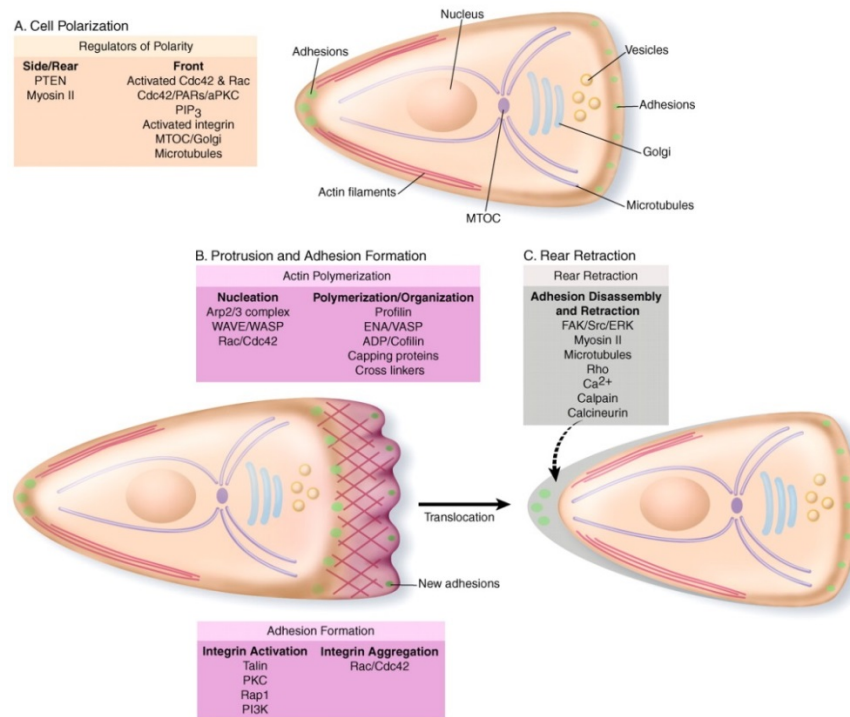


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zell-Migration

Die Migration einer Zelle umfasst einen repetitiven Zyklus. Die Voraussetzung dafür ist die Polarisation der Zelle. Zu Beginn der Migration bilden die Zellen am vorderen Ende („Leading Edge“) mittels Aktinpolymerisation Membranprotrusionen in Richtung der Migration aus und heften sich über Adhäsionsrezeptoren an dem Substrat fest. Durch Kontraktion des Zytoplasmas mittels Myosin IIa lösen sich die Adhäsionsrezeptoren vom Substrat im hinteren Bereich der Zelle („Trailing Edge“).

mit freundlicher Genehmigung von "The American Association for the Advancement of Science"; Science, Ridley (92), Copyright (2003)

3. Migration von Thrombozyten

Durch den Nachweis eines Aktomyosin-ähnlichen Proteins in humanen Thrombozyten durch Bettex-Galland et al. [15], wurde schon 1959 gezeigt, dass auch Thrombozyten über ein kontraktiles Zytoskelett verfügen und damit die molekulare Grundlage und Voraussetzung zur Migration besitzen. Bereits in den 1970er Jahren und in den Jahren darauf wurden Thrombozyten als Zellen mit potentieller Fähigkeit zur Migration dargestellt (14-19). Jedoch blieb der zugrundeliegende molekulare Mechanismus des Migrationsprozesses der Thrombozyten bisher unerforscht. Die Rolle sowie Relevanz der Thrombozytenmigration im lebenden Organismus ist bis heute unbeantwortet. Der Gruppe um Gärtner/Massberg gelang es, die Motilität von Thrombozyten innerhalb eines Thrombus *in vivo* mittels 2-Photonen-Mikroskopie darzustellen (99). Dabei konnte eine bislang unbeschriebene Motilität der Thrombozyten im Bereich des Thrombus

in vivo beobachtet werden. Nach Induktion einer Verletzung mittels mechanischer Manipulation sowie Verletzung des Gefäßes im Ohr durch Setzen eines Laserschadens wurde die Entstehung des Thrombus live verfolgt. Ein kleiner Anteil der Thrombozyten ($< 1\%$) blieb im Randbereich des Thrombus motil und veränderte seine Position. Es konnte eine aktive Bewegung entgegen dem Blutstrom beobachtet werden, was auf einen aktiven und autonomen Prozess schließen lässt. Zudem war die Geschwindigkeit der migrierenden Thrombozyten im Vergleich zu Thrombozyten, die ein typisches Entlangrollen an der Gefäßwand zeigten, deutlich reduziert (99). Die Wanderung der Thrombozyten war zudem unabhängig von der Retraktion des Thrombus (99). Bei der Retraktion ist eine kollektive Bewegung der Thrombozyten sichtbar, wohingegen bei der Migration einzelne Zellen auch sich entgegen dem Blutstrom bewegend beobachtet wurden (99).

Vor diesem Hintergrund wurde in der Arbeitsgruppe ein *in vitro* Assay etabliert um dieses Phänomen näher zu untersuchen (99). Voraktivierte Thrombozyten können auf mit Plasma-beschichteten Slides nach Aktivierung mit ADP (Adenosindiphosphat) und TXA_2 (Thromboxan A_2) migrieren. Zu Beginn werden die Zellen an der Oberfläche adhären und gehen dabei eine typische morphologische Veränderung ihres Zytoskeletts ein. Von einer zu Beginn der Adhäsion an der Oberfläche diskoiden Form beginnen sie zu polarisieren und nehmen durch Ausbildung von Protrusionen mit gleichzeitigem Einziehen des entgegengesetzten hinteren Teils der Zelle eine halbmondförmige Form an. Dabei wird der Pseudonukleus vom Zentrum der Zelle ans hintere Ende der Zelle verlagert (siehe Abbildung 3). Diese typischen morphologischen Veränderungen laufen als eine fortlaufende Kaskade während des Prozesses der Migration ab. Die Morphologie der migrierenden Zellen ergibt sich durch das Vorstülpen der Lamellipodien an ihrem vorderen Ende und simultanes Retrahieren der Lamellipodien am hinteren Ende. Die dabei typische Form der migrierenden Thrombozyten erinnert dabei stark an die äußerst motilen Keratozyten von Fischen (100).

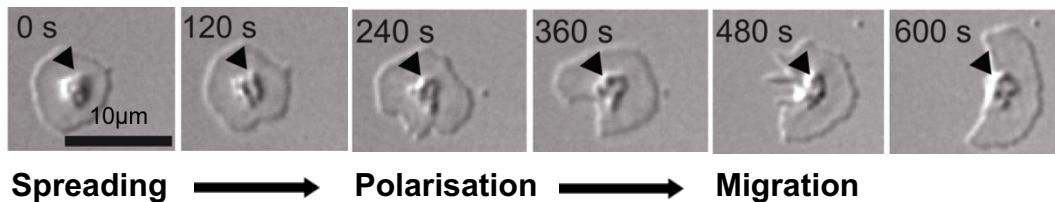


Abbildung 3: Migrierender Thrombozyt

Videosequenzen aus einer Phasen-Kontrast-Aufnahme

Während dem Vorgang der Migration findet eine typische Veränderung der Form der Thrombozyten statt. Mit dem Adhärenz-werden und Ausbreiten an der Oberfläche („Spreading“) nehmen sie eine diskoide, Spiegelei-ähnliche Form, an. Anschließend beginnen sie zu Polarisieren, wobei der Pseudonukleus (Pfeil) in den hinteren Bereich der Zelle („Trailing Edge“) rückt und die Thrombozyten schließlich während der Migration eine halbmondförmige Form annehmen.

Mit freundlicher Genehmigung von Florian Gärtner, *Autonomous Migration of Anucleated Platelets Facilitates Thrombus Consolidation*, Universitätsbibliothek der TU München (99)

3.1. MYH9-abhängige Migration

Kalzium spielt eine wichtige Rolle in der Funktion der Thrombozyten (101). Auch für den Vorgang der Migration ist es von Bedeutung. Die Erhöhung des intrazellulären Kalziums nimmt Einfluss auf die Migration der Zellen, indem es für die Aktivierung des Myosin IIa sorgt. Dabei ist die Kalzium-abhängige MLCK (Myosin light chain kinase) für die Phosphorylierung der Myosin light chain (MLC) und somit für die Aktivität des Myosin IIa verantwortlich (96). Myosin IIa sorgt initial für die Polarisierung der Zelle und während der Migration für die Retraktion des Zellkörpers und das Lösen der Adhäsionskontakte im hinteren Bereich (93).

Somit ist Myosin als Bestandteil des Zytoskeletts auch essentiell für die Migration. Thrombozyten von *PF4-Cre/MYH9^{fl/fl}*-Mäusen haben eine starke Reduktion in der Expression von Myosin in Megakaryozyten. Somit haben auch die in den Blutstrom entlassenen Thrombozyten einen stark reduzierten Anteil an Myosin (102) und sind nicht fähig zu migrieren. Myosin-defiziente Thrombozyten können zwar wie oben beschrieben polarisieren, jedoch kann die benötigte Kraft zur Lösung der Adhäsion des hinteren Teils des Zellkörpers (Trailing Edge), was die Zelle zur Wanderung befähigt, nicht aufgewandt werden (99).

3.2. α IIb β 3-Integrin-abhängige Migration

Von Leukozyten ist bekannt, dass sie während der Migration durch Integrine an der Oberfläche der Gefäße adhärieren (103). Thrombozyten exprimieren unter anderem das α IIb β 3-Integrin, das nach Aktivierung durch die Agonisten ADP und TXA₂ (104), für die Adhäsion und das Ausbreiten („Spreading“) der Thrombozyten sorgt. Dabei nehmen sie eine diskoide, mit ihrem zentral gelegenen Pseudonukleus an ein Spiegelei erinnernde, Form ein (99). Während der Migration ist das α IIb β 3-Integrin in Clustern über die Oberfläche der migrierenden Zellen im Bereich des vorderen Randes des Zellkörpers (Leading-Edges) verteilt. Fehlt Thrombozyten dieses Integrin, so sind sie weder fähig sich auszubreiten (Spreading) noch zu migrieren (99).

Fibrin(ogen) ist der physiologische Ligand des α IIb β 3-Integrins. Fibrin(ogen) kann physiologischerweise in löslicher Form von dem inaktiven α IIb β 3-Integrins nicht gebunden werden. Erst die Aktivierung der Thrombozyten führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wonach er sich in einer hochaffinen Form befindet und mit Fibrin(ogen) interagieren kann (33). Auf einer Fibrin(ogen)-beschichteten Oberfläche sind Thrombozyten in der Lage sich auszubreiten und unter Zugabe von Albumin und Kalzium, gehen sie die typische Formveränderung – von diskoider Form zu einer halbmondförmigen Form – ein und beginnen zu migrieren (99). Dabei konnte beobachtet werden, dass die adhärenenten Thrombozyten nach einem als Haptotaxis (105) beschriebenen Prinzip von niedrig konzentrierten zu höher konzentrierten Fibrin(ogen)flächen migrieren. Um diese Form der gerichteten Migration (Haptotaxis) durchzuführen sind sowohl die aus Aktin ausgebildeten Lamellipodien am vorderen Ende der Zelle (98) als auch die Myosinmaschinerie am hinteren Ende, welche für die Loslösung des hinteren Zellkörpers sorgt, entscheidend (99).

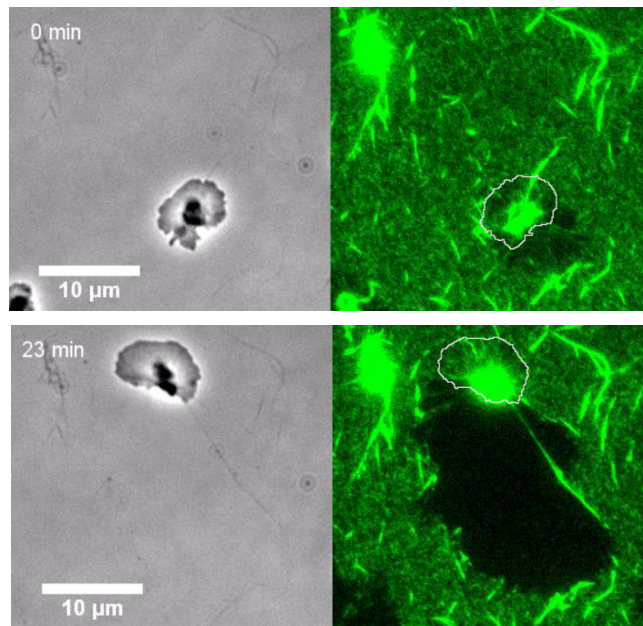


Abbildung 4: Migrierender Thrombozyt auf Fibrin(ogen)-Oberfläche

Videosequenzen auseinander *in vitro* Phasen-Kontrast (links) und Epifluoreszenz-Aufnahme (rechts) eines migrierenden Thrombozyten auf einer mit Alex Fluor-488 konjugierten Fibrin(ogen)-beschichteten Oberfläche.

Während der Migration entfernen Thrombozyten das Fibrin(ogen) und akkumulieren dieses an ihrer Oberfläche.

Mit freundlicher Genehmigung von Florian Gärtner, Institutsarbeit (Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern, AG Massberg), unpublizierte Daten

4. Inflammation und Sepsis

Bakterielle Infektionen sind eine häufige Todesursache, insbesondere bei immunsupprimierten, multimorbiden und geriatrischen Patienten (106). In der Sepsis kommt es zur vermehrten Aktivierung und Rekrutierung von zirkulierenden Immunzellen, insbesondere der Leukozyten, die für eine Bekämpfung der Pathogene sorgen (107). Das Zusammenspiel von angeborenem und adaptivem Immunsystem spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort des Körpers. In den letzten Jahren erlangten die Thrombozyten einen hohen Stellenwert als wichtige Komponente in diesem Zusammenspiel (8, 58, 108, 109). In der Literatur ist die Leber als zentrales Organ in der Beseitigung („Clearance“) von Bakterien beschrieben. Dabei wurde gezeigt, dass neben Leukozyten und Makrophagen Fibrin(ogen) und Thrombozyten involviert sind (10, 110).

4.1. Die Leber als wichtiges Organ in der Immunabwehr

Die Leber erhält Blut von zwei Gefäßsystemen: das oxygenierte systemische Blut und das venöse Blut, das über die Portalvene aus dem Interstitium zugeführt wird. In den dünnwandigen Lebersinusoiden trifft es aufeinander und mischt sich. Dabei passiert es eine große Population an Makrophagen, die als Kupffer-Zellen bezeichnet werden (111).

Die Sinusoide verlaufen zwischen den Hepatozyten, die den Großteil der Leberläppchen ausmachen (111). Leberläppchen (Lobuli) bilden die Funktionseinheit der Leber. Der Bereich in dem mehrere Läppchen zusammentreffen wird als Glissonsches Dreieck (Trias) bezeichnet. Dort liegen größere Blutgefäße (Äste der *A. hepatica*, *V. portae*), das Gallengangsystem und die Nerven. Zwischen den vielen Hepatozyten verlaufen Gefäße, die mit einer diskontinuierlichen Basalmembran und Endothelzellen ausgekleidet sind. Zusätzlich finden sich dort die spezialisierten Makrophagen der Leber, die Kupfferschen Sternzellen. Sie sind Teil des mononukleären Phagozytensystems (MPS) (111).

Neben der Funktion der Leber im Kohlenhydrat-, Fett-, Protein- und Vitaminstoffwechsel, hat die Leber vor allem in der Metabolisierung von endogenen und exogenen toxischen Substanzen sowie in der Beseitigung („Clearance“) partikulärer Substanzen aus dem Blut eine wichtige Bedeutung. Dabei spielen die spezialisierten Makrophagen, die Kupffer-Zellen, eine große Rolle. Sie sind als stationäre Makrophagen in den Sinusoiden strategisch gut positioniert um zirkulierende Pathogene zu fangen und zu phagozytieren (111). Durch dieses Netzwerk an Kupffer-Zellen erlangt die Leber eine immer größere Bedeutung als immunologisches Organ (112).

Viele Pathogene haben Strategien entwickelt um dem Immunsystem zu entkommen und in den ganzen Körper zu disseminieren, jedoch verfügt der Körper über eine Vielzahl an Mechanismen um diese Pathogene zu detektieren und sich davor zu schützen. Die Leber gilt als wichtiges Organ in der Clearance von Pathogenen. In der Mikrovaskulation (Sinusoide) findet eine Vielzahl an immunologischen Prozessen statt, was als intravaskuläre Immunität bezeichnet wurde (107). Über die Portalvene gelangen aus dem Dünn- und Dickdarm unter physiologischen

Bedingungen mikrobielle Produkte vom Verdauungsvorgang in die Leber. Unter den mikrobiellen Produkten findet sich unter anderem LPS, welches von der äußeren Membran gramnegativer Bakterien wie *E. coli* stammt (112). Unter normalen Bedingungen ist LPS im systemischen Blut nicht messbar, aber im venösen Blut der Portalvene kann der Gehalt an Endotoxinen bis zu 1 ng/ml betragen (113). Die Endothelzellen der Sinusoide und vor allem die Kupffer Zellen verfügen über LPS-Rezeptoren, womit sie das LPS binden können (114). Damit befreien sie das Blut von dem toxischen Stoff und bewahren den Körper vor einer Endotoxämie. Die Leber hat sich ständig mit diversen Toxinen auseinanderzusetzen und ist besonders gegen gramnegative Bakterien effektiv ausgestattet. In bakteriellen Entzündungen mit *E. coli* wurde eine Ablagerung von Fibrin(ogen) in den Sinusoiden gezeigt und auch eine Beteiligung von Thrombozyten konnte bereits nachgewiesen werden (9, 10, 110). Auch grampositive Bakterien wie *Staphylococcus aureus* werden in der Leber zurückgehalten und die Thrombozyten wurden als Interaktionspartner von Kupffer-Zellen in diesem Prozess beschrieben (10).

4.2. Zelluläre Komponenten der Inflammation

Neutrophile Granulozyten gelten als die ersten Zellen, die mit Pathogenen in Kontakt treten. Nach Aktivierung setzen sie Serinproteasen frei, die eine der Hauptkomponenten der antimikrobiellen Bekämpfungsstrategie von Säugetieren darstellen und die Pathogene wie Bakterien, aber auch Pilze, inaktivieren können (115-117). Eine weitere Möglichkeit von neutrophilen Granulozyten zur Bekämpfung von Pathogenen ist die Freisetzung von NETs (Neutrophile extracellular traps). Dabei handelt es sich um nukleäre DNA, auf der antibakterielle Proteine und Enzyme gebunden sind. Nach Freisetzung umschließen sie die Bakterien netzartig und vermögen diese durch die aufgelagerten antibakteriellen Enzyme und Proteine zu eliminieren (118). Neben aktivierten Endothelzellen sind auch aktivierte Thrombozyten in der Lage, die Ausschüttung der NETs von neutrophilen Granulozyten zu induzieren (119, 120). Dieser Kontakt zwischen neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten, welcher durch LFA-1 vermittelt wird, wurde als entscheidende Komponente in der Aktivierung

der neutrophilen Granulozyten zur Ausschüttung der NETs erforscht (9). Die Leukozyten gelten als „Überwacher“ und fortwährende „Prüfer“ der Blutgefäße, die bei Invasion von Pathogenen sofort reagieren und die ersten „Ansprechpartner“ sind.

Von Paul Kubes et al. (10) wurde in der Mikrozirkulation der Leber gezeigt, dass Thrombozyten bei bakteriellen Infektionen lange vor den neutrophilen Granulozyten in den Sinusoiden erscheinen und in Kontakt mit Makrophagen treten und diese in der Beseitigung der Pathogene unterstützen. Dieser Kontakt zwischen den Thrombozyten und den professionellen Kupffer-Zellen wurde auch unter physiologischen Bedingungen beobachtet. Dabei gehen die Thrombozyten für sehr kurze Zeit (<1 Sekunde) über den auf der Oberfläche der Kupffer-Zellen befindlichen vWF Bindungen mit diesen ein. Nach einer Infektion mit dem gram-positiven Bakterium (*Staphylococcus aureus*) wurde jedoch ein länger andauernder Kontakt zwischen den Thrombozyten und Makrophagen beobachtet. Es kommt zur Rekrutierung einer großen Anzahl an Thrombozyten, die Aggregate um die Bakterien bilden und somit die Makrophagen in der Eliminierung der Pathogene unterstützen (10).

In einem akuten Sepsis-Modell mit *E. coli* wurde gezeigt, dass es innerhalb der Mikrozirkulation der Leber zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten kommt und damit einhergehend zur Ablagerung/Deposition von Fibrin in den Sinusoiden (110). Diese durch neutrophile Granulozyten vorangetriebene Koagulation während einer systemischen Infektion verursacht eine Kompartimentalisierung der Bakterien innerhalb der Zirkulation und verhindert somit eine Extravasation und Invasion der Bakterien in das Gewebe. Dabei wurden auch Fibrinablagerungen in der Mikrozirkulation der Lebersinusoiden gezeigt. In diesem Modell konnte eine Beteiligung von Fibrin(ogen) gezeigt werden, Thrombozyten wurden allerdings in diesem Zusammenhang nicht untersucht. Eine Beteiligung von Thrombozyten in der Inflammation und deren Interaktion mit verschiedenen Pathogenen ist bereits bekannt. Doch das Vorkommen und die Relevanz der Migration der Thrombozyten in diesem Zusammenhang sind bisher unerforscht.

III.ZIELSETZUNG

Ausgehend von den einleitend zusammengefassten wissenschaftlichen Grundlagen wird folgender Fokus in der vorliegenden Arbeit gesetzt:

- 1. Evaluierung verschiedener Modelle zur Untersuchung der Migration von Thrombozyten *in vivo***
- 2. Vorkommen und Relevanz der Thrombozyten-Migration in der Inflammation**
 - a) *In vivo* Interaktion von Thrombozyten und Fibrin(ogen) innerhalb der Mikrovaskulation der Leber – Fibrin(ogen) als Promotor für Migration
 - b) *In vivo* Thrombozyten-Pathogen-Interaktion in der Mikrovaskulation der Leber anhand Thrombozyten-migrationsdefizienter Mauslinien.
- 3. Thrombozyten und ihre potentielle Rolle als voll entwickelte Zellen des angeborenen Immunsystems**

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro*-Versuche wurden an dem Versuchstier Maus durchgeführt. Aufgrund der bekannten Physiologie, der hohen Reproduktionsrate, des geringen Platzanspruches und der sich daraus ergebenden niedrigen Haltungskosten, eignet sich die Maus sehr gut als Versuchstier. Viele der in der biomedizinischen Forschung verwendeten Modelle wurden an der Maus etabliert. Des Weiteren stehen von dieser Tierart eine große Zahl an verschiedenen genetisch veränderten Knockout-Stämmen zur Verfügung. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde dies genutzt, um ein besseres Verständnis der *in vivo*-Thrombozytenmigration zu erhalten.

Es wurden folgende Stämme im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

- C57BL/6J
- Rosa26mT/mGxPf4Cre
- CD41YFP
- Pf4-CrexMYH9^{fl/fl}- Chimären

1.1. Wildtypstamm C57BL/6J

Bei den C57BL/6J-Mäusen handelt es sich um einen Inzuchtstamm. Dieser Stamm findet eine sehr weit verbreitete Anwendung auf verschiedenen Gebieten, wozu auch die kardiovaskuläre Forschung zählt. Außerdem werden sie standardmäßig in der Generierung von transgenen Mäusen eingesetzt. Alle hier verwendeten Tiere wurden auf dem Hintergrund von C57BL/6J gezüchtet. Die C57BL/6J-Mäuse wurden sowohl als Kontrolltiere als auch als behandelte Versuchstiere verwendet. Die Tiere wurden kommerziell von Charles River Laboratories bezogen. Nach Ankommen der Tiere wurden sie in die Tierhaltung eingesetzt und frühestens nach sechs Tagen in den Versuch genommen, um so eine Erholung von dem Transportstress und eine Gewöhnung an die neue Umwelt zu bieten.

1.2. Rosa26mT/mGxPf4Cre

In der Pf4-Cre Mauslinie steht die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Promotors Pf4 (Platelet factor4). Vor Exposition der Cre-Rekombinase fluoresziert ein Großteil der Zellmembranen und Gewebe in rot. Der Rosa26mT/mG-Reporter führt nach Aktivierung zu einer Farbänderung der exprimierenden Zellen von rot auf grün (RFP zu GFP) (121). Zellen, in denen nicht Cre exprimiert wird, behalten die rote Farbe (RFP) bei. Dadurch sind die Pf4-positiven Thrombozyten (grün) deutlich von den anderen Zellpopulationen zu unterscheiden und können so *in vivo* verfolgt werden.

1.3. CD41-YFP

Bei diesem Mausstamm handelt es sich um eine Knock-in-Linie, die unter der Kontrolle des endogenen CD41-Promotors, welcher megakaryozyten- und thrombozytenspezifisch ist, ein membranverankertes, gelb-grün fluoreszierende Protein eYFP (enhanced yellow fluorescent protein) anstelle der α IIb-Integrinuntereinheit exprimiert und sich somit als Reportermaus für das Live-Imaging von CD41/GPIIb-exprimierenden Zellen eignet (122). Homozygote Tiere dieser Linie, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind de facto funktionelle GPIIb/IIIa (α IIb β III-Integrin)-Knockouts. Aufgrund des nicht-funktionsfähigen Integrins sind Thrombozyten dieses Stammes nicht in der Lage, an Fibrin(ogen) zu binden und *in vitro* an einer Fibrin(ogen)-Oberfläche adhärent zu werden, beziehungsweise sich auszubreiten und somit zu migrieren (99).

1.4. MYH9 defiziente Mäuse

Bei dem Stamm PF4-Cre x MYH9^{fl/fl} handelt es sich um eine transgene Linie, die eine spezifische Ablation des MYH9-Gens in den Megakaryozyten aufweist, welche letztlich eine fast vollständige Defizienz des Myosins in den aus den Megakaryozyten im Knochenmark hervorgehenden Thrombozyten zur Folge hat (102). Ausgehend von den PF4-Cre x MYH9^{fl/fl}-Tieren wurden Knochenmarks-Chimären generiert, dabei dienten C57BL/6J als Empfängertiere.

Bei diesem Stamm liegt eine Mutation des MYH9 (Myosin-heavy-chain 9) Gens vor, welches für die NMHC IIA (non muscle myosin heavy chain IIA), die einzige in Thrombozyten bekannte Isoform der schweren Kette, kodiert. Das MYH9-Protein ist eine wichtige Untereinheit des Myosins und somit für dessen Funktion essenziell.

Die Aggregation und Sekretion dieser Thrombozyten ist normal. Jedoch führt die vorliegende Makrothrombozytopenie dieser Tiere und die defekte Kontraktionsfähigkeit ihrer Thrombozyten, welche unabdingbar bei der Bildung eines Thrombus ist und für dessen Stabilität sorgt, zu einer stark gestörten Hämostase und damit einhergehenden erhöhten Blutungsneigung (102).

MYH9 ist ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts, welches eine entscheidende Rolle in der Motilität der Zelle spielt (94). Die Migration als aktomyosin-abhängiger Prozess ist somit bei diesen Tieren gestört. *In vitro* sind diese Thrombozyten fähig, Lamellipodien auszubilden, die Bildung sogenannter Stressfiber (Bündel an Aktin, deren Kontraktilität durch Bindung von Myosin an Aktin zustande kommt) ist jedoch beeinträchtigt (102), was dazu führt, dass MYH9-defiziente Thrombozyten dieses Stammes nicht die für die Migration benötigten Kontraktionskräfte erreichen können.

1.4.1. Erstellung von MYH9^{-/-} Chimären

Die isolierten Knochenmarkszellen der Spendertiere (PF4-Cre x MYH9^{fl/fl}) wurden in davor letal bestrahlte Empfängertiere (C57BL/6J) verbracht. Die Tiere konnten nach einer Wartezeit von mindestens 8 Wochen in den Versuch genommen werden.

Das Versuchsvorhaben wurde von der Regierung Oberbayerns gemäß § 7 des Deutschen Tierschutzgesetzes (Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 4 Absatz 87 des Gesetzes vom 18. Juli 2016 (BGBl. I S. 1666) geändert worden ist) genehmigt. (Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-197-13).

1.4.2. Bestrahlung

Zunächst erfolgte eine Bestrahlung der Empfängertiere, um so das endogene Knochenmark zu zerstören. Zur Bestrahlung wurden die Tiere in ein Rondell aus Kunststoff eingesetzt, wobei die Mäuse durch Kammern voneinander getrennt waren. Das Rondell mit den Mäusen wurde in das Bestrahlungsgerät (Xstrahl Cabinet Irradiator, RS225, Camberley, United Kingdom) verbracht und mit 6,5 Gray bei 10 Milliampere für vier Minuten und drei Sekunden bestrahlt. Am darauffolgenden Tag wurde die Bestrahlung der Tiere mit derselben Dosis wiederholt. Die Implantation der isolierten Zellen der Spendertiere erfolgte unmittelbar nach der zweiten Bestrahlung über die Schwanzvene. Der Abstand zwischen beiden Bestrahlungen, die nur kumulativ letal sind, sollte nicht länger als 4–8 Stunden betragen. Ansonsten ermöglichen DNA-Reparaturmechanismen ein besseres Überleben der endogenen Zellen. In vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass dieses Bestrahlungsschema zu einem nahezu 100 %igem Chimärismus des Spenderknochenmarks führt (123). Zur Überprüfung des Chimärismus wurden Thrombozyten der Tiere isoliert und deren Migrationsverhalten *in vitro* untersucht.

1.4.3. Präparation von Knochenmark

Das Spendertier wurde mit Isofluran (IsofluranCP, cppharma, Burgdorf) narkotisiert und anschließend mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Oberfläche des Tieres wurde mit Ethanol (Merck, Schuchardt, OHG Hohenbrunn) desinfiziert und die Gliedmaßen von Haut und Muskulatur frei präpariert. Anschließend wurden die Gliedmaßen am Hüftgelenk beziehungsweise Schultergelenk abgesetzt. Humerus und Femur sowie Radius, Ulna und Tibia wurden sorgfältig von der restlichen Muskulatur frei präpariert und in eine Zellkulturschale mit vorgekühltem Puffer (PBS + 5 % FBS (Fetal Bovine Serum, InvitrogenTM, Carlsbad, USA) + 2 mM EDTA (Ethyldiamintetraacetat, Sigma Aldrich, Steinheim) transferiert. Die weitere Bearbeitung fand unter einer Sterilbank statt. Im nächsten Schritt wurde der Knochen im Bereich der proximalen und distalen Epiphyse mit Hilfe eines Skalpell abgesetzt. Die somit eröffnete Markhöhle wurde mit Hilfe einer Kanüle (26G, BD Microlance, Becton Dickinson Labware,

Franklin Lakes, USA) und einer den Puffer enthaltenden Spritze (B. Braun, Melsungen) gespült und über ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 µm (CellStrainer, 70 µm Nylon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) in einem unter dem Sieb befindlichen 50 ml Zentrifugenröhrchen (50 ml Polypropylen Conical Tube, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) aufgefangen. Dieser Vorgang der Spülung wurde so oft wiederholt bis die Knochen transluzierend waren. Nachdem das Zentrifugenröhrchen mit dem Puffer auf 30 ml aufgefüllt wurde, folgte die Zentrifugation bei 600 x g, 4 °C für 5 Minuten (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde mit einer Vakuumpumpe (Vacuubrand GmbH + CO KG, Wertheim) abgenommen und das Pellet mit 2,5 ml 8 % Ammoniumchlorid-Lösung (1,5 M NH₄Cl + 0,1 M KHCO₃ + 10 mM EDTA, SigmaAldrich, Steinheim) resuspendiert und bei 4 °C für 4 Minuten inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurde mit dem Puffer erneut auf 30 ml aufgefüllt und es folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt bei gleichen Bedingungen. Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Zellpellet in 2 ml RPMI Medium (Biochrom AG, Berlin) resuspendiert. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen mittels einer Neubauer Zählkammer ausgezählt, dabei ergibt der Mittelwert aus den vier äußeren Großquadranten multipliziert mit dem Kammerfaktor 10.000 die Zellzahl pro Milliliter. Die injizierte Zellzahl pro Maus betrug dabei mindestens 5 Millionen Zellen. Die Injektion erfolgte über die Schwanzvene in einem Gesamtvolumen von 200 µl.

2. Tierhaltung und Hygienemanagement

Tiere aus der eigenen Zucht wurden in einer spezifiziert pathogenfreien Tierhaltung des ZNP (Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung München) gehalten. Die Tierhaltung und damit einhergehende Hygiene ist ein in der Forschung ernstzunehmender Faktor.

Denn nur aus Tieren die frei von denjenigen Pathogenen sind, welche die Physiologie des Tieres und die Zucht der entsprechenden Linien maßgeblich beeinträchtigen, können aussagekräftige experimentelle Daten generiert und interpretiert werden (124).

Die Haltung der Tiere der eigenen Zucht erfolgte auf SPF-Niveau (spezifisch-pathogen-frei). Am Eingang befinden sich eine Schleuse für das Personal, sowie ein Durchreichautoklav für eingebrachtes Material, zusätzlich eine Wasserstoffperoxidschleuse und eine Überdrucklüftung. Die Tiere wurden in Gruppen von mindestens zwei aber höchstens vier Tieren in einem Makrolon-Käfig vom Typ II long gehalten. Es wurde entkeimtes, staubarmes, sehr saugfähiges Weichholzgranulat (Firma Abbed Nestbaumaterial) verwendet, welches einmal wöchentlich gewechselt wurde. Die Käfige wurden bei 80 °C in der Waschanlage gewaschen und anschließend für 20 Minuten bei 121 °C und unter 2 bar Druck autoklaviert. Die Beleuchtung wurde auf einen geregelten Tag-Nacht-Rhythmus mit einer zwölfstündigen Hell-Dunkel-Phase eingestellt. Bei der Hell-Phase betrug die Beleuchtungsstärke 50 bis 100 Lux. Autoklaviertes Leitungswasser aus einer Trinkflasche für Nager sowie pelletiertes, artgerechtes Futter (#1320 Ratte/Maus Haltungsdiät, Altromin, Lage) stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Zusätzlich waren die Käfige mit Enrichment wie Häuschen aus Pappe, Holzspäne und Nistmaterial ausgestattet um den Tieren einen möglichst artgerechten Lebensraum zu bieten.

Die verwendeten Tiere wurden im Falle der C57BL/6J- Tiere kommerziell von Charles River Laboratories bezogen und anschließend in die Cabinet (Zoonlab GmbH, UniProtect, Castrop-Rauxel, Germany) der Tierhaltung im Walter-Brendel-Zentrum eingesetzt. Dort wurden unter FELASA-Bedingungen (Federation of European Laboratory Animal Associations) in Tierhaltungsschränken (Bioscope Uniprotect, Bioscope GmbH, Castrop-Rauxel) in Makrolon-Käfigen vom Typ II long in Gruppen von mindestens zwei aber maximal vier Tieren gehalten. Die Käfige waren mit staubarmer, saugfähiger Einstreu (Abbed Nestbaumaterial B E-011, Faserbreite 3,5 mm, E-012, Faserbreite 4 mm + NBU E014, Faserbreite 120 mm) sowie Häuschen aus Pappe und Späne als Enrichment ausgestattet. Futter (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) sowie Wasser über die Nagertrinkflasche stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Einmal wöchentlich wurden die Tiere in frische Käfige umgesetzt. Die Tierhaltungsschränke boten den Tieren ein Mikroklima von 22 ± 1 °C bei

einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5 \%$ und waren auf einen Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden eingestellt. Der Zugang zu den Räumlichkeiten war nur bestimmten Personen unter Tragen von Schutzkleidung gewährt um so für eine Reduzierung der Keim- und Stressbelastung der Tiere zu sorgen. Alle vier Monate wurde ein erweitertes Hygiene-Monitoring nach FELASA-Richtlinien durchgeführt, wobei stichprobenartige Untersuchungen nach dem kleinen FELASA-Protokoll vorgenommen wurden.

Zur kurzfristigen Haltung der in den Versuch genommenen Tiere befand sich im Tier-OP ein Ventitaled Cabinet (Tecniplast, Ventilated Storage Cabinet, Italien) um so die Tiere unter ständiger tierärztlicher Beobachtung zu haben.

3. Anästhesie

Die allgemeine Anästhesie wurde mit der Inhalation von Isofluran eingeleitet. Verabreicht wurde es über einen Isofluranverdampfer (Ohmedalsotec 3, Fa. Eickmeyer, Tuttlingen), wobei Sauerstoff als Trägergas dient. Isofluran ist ein halogener Ether und flutet rasch im Gehirn an und führt zu einer Relaxation der Muskulatur. Genauso rasch wird das Isofluran mit einer sehr niedrigen Metabolisierungsrate ($<0,2 \%$) wieder vorwiegend unverändert über die Lunge abgeatmet. Jedoch weist es nur eine sehr schwach ausgeprägte analgetische Wirkung auf (125).

Zur Analgesie befand sich in der darauffolgenden Injektionsanästhesie Fentanyl. Fentanyl (HEXAL, Hexal AG, Holzkirchen) gehört zur Klasse der Opiode. Es hat eine sehr hohe Selektivität für μ -Opioidrezeptoren und weist eine 80-fach höhere Wirkpotenz als das natürliche Opioid Morphin auf (125). Die Narkose ist durch Bewusstlosigkeit, Aufhebung der Schmerzempfindung und Muskelrelaxation charakterisiert (125). Neben Fentanyl beinhaltet die Triplenarkose Midazolam und Metedomidin. Metedomidin ist ein α_2 -Adrenoreceptoragonist und wird zur Sedation eingesetzt. Midazolam ist ein Vertreter der Benzodiazepine und wirkt vor allem im limbischen System. Es führt zur Sedation, Anxiolyse, sowie Muskelrelaxation (125). Die Applikation der in der Triplenarkose enthaltenen Substanzen erfolgt intraperitoneal, wobei $5,0 \text{ mg/kg}$

Midazolam (Midazolam-hameln, Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln) 0,5 mg/kg Metedomidin (Dorbene, Pfizer GmbH, Berlin) und 0,5 mg/kg Fentanylverdünnt mit 0,1 ml 0,9 %-NaCl-Lösung (Isotonische Kochsalzlösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) in einer Mischspritze verabreicht wurden. Durch Kombination der in der Triplenarkose enthaltenen Wirkstoffe konnte eine Allgemeinanästhesie, definiert durch Hypnose, Relaxation und Analgesie, erreicht werden.

3.1. Durchführung der Narkose

Zunächst wurde das Tier in eine Plexiglasröhre verbracht und die allgemeine Anästhesie mit der Inhalation von Isofluran (IsofluranCP, cpharma, Burgdorf) eingeleitet. Nach Erlöschen der Stellreflexe sowie Verlangsamung der Atmung wurde das Tier aus der Röhre entnommen und die Triplenarkose (Metedomidin, Midazolam, Fentanyl) intraperitoneal verabreicht. Bis zum Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurde das Tier in eine Schlafbox gelegt um es vor visuellen und akustischen Reizen abzuschirmen. Zur Vergewisserung des Erreichens des chirurgischen Toleranzstadiums wurden nach zirka 10 Minuten die Reflexe geprüft. Bei Abwesenheit der Reflexe wurde mit dem operativen Eingriff begonnen.

3.2. Narkosemanagement und -überwachung

Durch Beobachtung der Atmung sowie Prüfen des Zwischenzehenreflexes wurde die Narkosetiefe beurteilt und engmaschig überwacht. Alle 30 bis 45 Minuten wurde während längerer Eingriffe eine halbe Dosis einer Mischspritze nachgegeben. Während der kompletten Narkosedauer wurde die Körpertemperatur durch eine unter dem Tier angebrachte Wärmematte (ThermoLux-Wärmematte, Fa. Dehner, Rain (Lech)) aufrechterhalten, um eine Hypothermie bei länger andauernden Eingriffen zu vermeiden. Um einem Austrocknen der Augen vorzubeugen, wurde zu Beginn der Narkose Augensalbe mit 5 %-igem Dexpanthanol (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) aufgetragen und bei Bedarf während längerer Eingriffe wiederholt.

4. Intravenöse Applikation

4.1. Schwanzvenenkatheter

Die Injektion der fluoreszierenden Farbstoffe und Antikörper sowie Bakterien erfolgte über einen Schwanzvenenkatheter. Dieser wurde in eine der beiden lateral verlaufenden Venen (*Venae coccygeae laterales*) platziert. Der Katheter findet sowohl bei einmaligen Injektionen am wachen Tier als auch als Venen-Verweil-Katheter am narkotisierten Tier Verwendung.

Zuerst wurde ein Polyethylenschlauch (Fine Bore Polyethene Tubing, 0,28 mm ID 0,61 mm OD, Smiths Medical International Ltd., Hythe, UK), an dessen vorderem Ende eine Nadel einer 30G Kanüle (BD Microlane™ 3, Becton Dickinson and Company Limited, Drogheda, Louth, Irland) mit abgeknicktem Konus angebracht wurde und dessen hinteres Ende mit einer intakten Kanüle versehen wurde, vorbereitet. Durch das Aufsetzen einer 1 ml -Spritze (B.Braun, Melsungen) wurde der Schwanzvenenkatheter mit 0,9 %-NaCl-Lösung gespült und auf Durchgängigkeit geprüft. Es wurde genau darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen in dem Schlauch bzw. Konus der Spritze befanden.

Das narkotisierte Tier wurde in Seitenlage gebracht und das Gefäß durch Druck mittels Zeige- und Mittelfinger an der Schwanzbasis gestaut. Durch Zuhilfenahme eines Nadelhalters wurde der Katheter in die Schwanzvene eingebracht.

Zur Injektion am wachen Tier wurde das Tier in eine Fixationsvorrichtung (Injektionskäfig, Typ Broome HAR-52-04, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Jugenheim) verbracht. Bei dieser Vorrichtung bleibt der Schwanz der Maus freiliegend. Der Schwanz wurde an der Basis durch leichten Druck zwischen Zeige- und Mittelfinger gestaut und der Katheter unter Zuhilfenahme eines Nadelhalters in die Vene platziert. Nach erfolgter Applikation wurde die Injektionsstelle mit einem Tuch (Wypall, Kimberly-Clark, Koblenz) komprimiert um etwaige Blutungen zu stillen.

4.2. Femoraliskatheter

Nach erfolgter Narkose wurde das Tier in Rückenlage gebracht und die Gliedmaßen mit Klebestreifen fixiert. Nach Prüfung des Zwischenzehenreflexes erfolgte ein zirka 1,5 Zentimeter langer Hautschnitt im Bereich der Innenseite des linken Oberschenkels. Nach Entfernung des Hautlappens wurden die in einem Bündel verlaufenden Gefäße und der Nerv, *V. femoralis*, *A. femoralis* und *N. femoralis*, unter einer bindegewebigen Schicht sichtbar. Nun wurden Gefäß und Nerv vorsichtig von dem umliegenden Bindegewebe befreit und anschließend unter äußerster Vorsicht Vene und Nerv stumpf von der Arterie freipräpariert bis es möglich war, die Arterie zu untertunneln. Im proximalen Segment wurde die Arterie mit einer Klemme abgeklemmt und knapp darunter ein einfacher chirurgischer Knoten vorgelegt. Im distalen Bereich wurde das Gefäß mit einer gebogenen Pinzette unterfahren und ein zirka zwei Zentimeter langes Fadenstück der Stärke 8-0 (Prolene, monofil, nicht resorbierbar, B. Braun Aesculap AG & CO. KG, Tuttlingen) unter der Arterie hindurch gezogen. Ebenso wurde im distalen Bereich ein einfacher chirurgischer Knoten vorgelegt. Das Gefäß wurde mit einer 30G Kanüle vorsichtig inzidiert und ein Polyethylen-Katheter eingeführt, der bis zur Klemme vorgeschoben wurde. Anschließend wurden die vorgelegten Knoten zugezogen um den Katheter zu fixieren. Um das Gefäß und das umliegende Gewebe vor Austrocknung zu schützen, wurde die Haut mit einer fortlaufenden Naht verschlossen.

5. Blutentnahmemethoden

5.1. Intrakardiale Blutentnahme

Zur Analyse großer Blutmengen wurde die intrakardiale Blutentnahme als Entnahmemethode gewählt. Bei einer 25 g schweren Maus erhält man zirka zwei Milliliter Blut.

An dem sich in Rückenlage befindlichen Tier wurde eine Inhalationsanästhesie mit Isofluran durchgeführt. Zur Schmerzausschaltung erfolgte vorab eine intraperitoneale Injektion von Fentanyl.

Nach Feststellung einer erwünschten Narkosetiefe durch Prüfung der ausbleibenden Schmerzreflexe wurde Alkohol zur Befeuchtung des Fells im Brustkorbbereich aufgesprüht. Mit einer Schere wurde median ein Hautlappen in Höhe der Schulterblätter entfernt, um so direkten Blick auf Sternum sowie Rippen zu ermöglichen. Nach Aufsuchen der zweiten Rippe, wurde links-parasternal direkt hinter der zweiten Rippe in einem Winkel von 90° mit einer 26G-Kanüle (BD MicrolaneTM3, Becton Dickson and Company Limited, Drogheda, Louth, Irland) transthorakal bis zum Herzen eingegangen und vorsichtig mit einer mit Antikoagulanzen benetzten 2 ml-Spritze (BD Discardit, Becton Dickinson S.A., Fraga, Huesca, Spanien) ein Milliliter Blut aspiriert. Vorbereitet wurden je nach Protokoll Spritzen mit 141 µl ACD (Acid-Citrat-Dextrose), zur Thrombozytenisolation bzw. Plasmagewinnung. Unmittelbar nach Punktion des Herzens wurde zur Erlösung des Tieres eine kraniozervikale Dislokation durchgeführt.

5.2. Blutentnahme über *Vena facialis*

Die Blutentnahme aus der *Vena facialis* eignet sich gut zur Gewinnung kleinerer Blutvolumina (bis zu 150 µl). Vor Beginn der Blutentnahme wurden die Tiere mit einer subkutanen Gabe von Buprenorphin (Temgesic, Reckitt Benckiser Healthcare, Hull, UK) analgetisch abgedeckt. Bei Buprenorphin handelt es sich um ein Morphinderivat (125). Es ist ein partieller Opiat-Agonist mit sehr hoher Affinität an μ -Opioidrezeptoren und antagonistischer Wirkung an κ -Opioidrezeptoren. Die Wirkungsdauer von Buprenorphin beträgt 8-10 Stunden (125).

Nach subkutaner Injektion des Schmerzmittels und einer Wartezeit von 30 Minuten, wurde das Tier mit Isofluran (IsofluranCP, cpharma, Burgdorf) betäubt. Nach Relaxation wurde das Tier aus der Röhre entnommen und in Seitenlage gebracht. Das Tier wurde im Nacken fixiert um die Vene anzustauen. Mit einer Blutlanzette (Solofix, B. Braun Melsungen AG, OPM, Melsungen), wurde 3-4 mm kaudodorsal des Haarwirbels („freckle point“) ein kurzer Stich gesetzt und so die Vene punktiert. Eine Einstichtiefe von 4 bis 5 Millimeter hat sich dabei mit einer entsprechend langen Lanzette bewährt (16). Die hervortretenden Blutstropfen wurden mit einer EDTA-Küvette (Microvette 100 K3E, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) aufgefangen. Um Hämatome zu

vermeiden wurde anschließend der Stau der Vene gelöst und mit einem Wattestäbchen komprimiert, bis die Blutung gestillt war. Zum Aufwachen wurde die Maus wieder in den Käfig zurückgesetzt.

6. Intravitalmikroskopie (IVM)

Gerade wegen der geringen Größe der Maus und der demzufolge guten Handhabung eignet sich diese Spezies gut für intravitalmikroskopische Aufnahmen. Es ist möglich auf zellulärer Ebene Vorgänge in physiologischer Umgebung und Echtzeit zu verfolgen. Mit Hilfe transgener Mauslinien, bei denen bestimmte Zellen Fluoreszenzproteine exprimieren, ist es möglich, verschiedenste zelluläre Bestandteile und Strukturen zu markieren und diese mit den verschiedenen Fluoreszenz-Mikroskopietechniken sichtbar zu machen und *live* zu verfolgen. Ebenso ist dies entweder mittels Injektion *ex vivo* gefärbter, isolierter Zellen als auch durch eingebrachte fluoreszierender Farbstoffe möglich. Dieser Methodik liegt das physikalische Phänomen der Fluoreszenz zu Grunde.

6.1. Fluoreszenz

Es gibt viele sowohl natürlich vorkommende als auch synthetische Stoffe, die bei energetischer Anregung eine spontane Emission von Licht zeigen, was man als Fluoreszenz bezeichnet. Fluoreszenz entsteht, wenn in einem fluoreszierenden Molekül ein Elektron ein Photon absorbiert und somit auf ein höheres Energieniveau gehoben wird. Auf diesem höheren Energieniveau bleibt das Elektron für einige Nanosekunden und fällt anschließend auf ein niedrigeres Energieniveau wieder zurück und gibt dabei ein Photon ab (126, 127). Dabei emittiert es ein langwelliges, energieärmeres Licht, als das des Photons zur Anregung. Diese Differenz zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum bezeichnet man auch als Stoke Shift (128).

Dieses Phänomen der Fluoreszenz machte man sich in der Mikroskopie zu Nutze. Oskar Heimstädt entwickelte Anfang des 19. Jahrhunderts das erste Fluoreszenzmikroskop, womit Autofluoreszenz in organischem und anorganischem Material untersucht wurde (129). Einen großen Schritt weiter gelangte man knapp 20 Jahre später (1929) mit der Erfindung des Epifluoreszenz-Mikroskops von Ellinger und Hirt (130). Heute gibt es viele

verschiedene Mikroskope, die mit Fluoreszenz arbeiten. Darunter das Konfokalmikroskop, welches eine Weiterentwicklung des Epifluoreszenz-Mikroskops ist, oder Laser Scanning Mikroskope, bei denen ein Laser zur Anregung verwendet wird.

In dieser Arbeit wurde mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop sowie einem 2-Photonen-Mikroskop gearbeitet.

6.2. 2-Photonen-Mikroskopie

Bereits in den 1930er Jahren wurde das physikalische Prinzip des 2-Photonen-Effekts erstmals von Maria Goeppert-Mayer beschrieben (131). In den 1990er Jahren wurde er dann erstmal in der Mikroskopie angewandt (132).

Die 2-Photonen-Mikroskopie ist eine Form der Fluoreszenz-Mikroskopie. Das Besondere dabei ist, dass ein Elektron des Moleküls im Gegensatz zur klassischen Fluoreszenzmikroskopie gleichzeitig mit zwei langwelligen Photonen angeregt wird. Die zwei Photonen müssen dabei gleichzeitig innerhalb von Femtosekunden (fs) zusammen eintreffen, um so eine ausreichende Anregung der Elektronen zu gewährleisten (133). Dabei wird nur ein sehr kleiner Bereich angeregt und man erhält nur von dem kleinen Bereich die Emission der Photonen. Der Vorteil ist dabei, dass mit einer längeren Wellenlänge angeregt werden kann und die Phototoxizität dabei gering gehalten wird (134), was ein *in vivo* Imaging über längere Zeit möglich macht. Die Anregung des Elektrons geschieht über einen Infrarot-Laser (680-1040 nm). Ein weiterer Vorteil ist, dass man eine Eindringtiefe von bis zu 1000 µm erreichen kann. Aufgrund seiner hohen Eindringtiefe eignet sich das 2-Photonen-Mikroskop besonders gut für *in vivo* Experimente, bei denen tiefere Schichten eines Gewebes untersucht werden sollen, da es sich auch in tieferen Schichten durch eine hohe Auflösung und einen hohen Kontrast auszeichnet (135).

Über Photodetektoren (PMT, Photo multiplier tube) werden die entstehenden Photonen detektiert. Die über Mikrosekunden zusammengelagerten Signale werden zu den individuellen Pixeln eines Bildes durch den Computer zugeordnet (136). Dabei ist es möglich die Aufnahmen als Live-Bild am Monitor zu verfolgen.

Für die in der Arbeit vorkommenden Versuche wurde ein 2-Photonen-Mikroskop der Firma LaVisionBiotech (Trim Scope II, Bielefeld) verwendet. Die Aufnahmen erfolgten mit einem 16x-fach Wasserimmersionsobjektiv mit der numerischen Apertur(NA) 0,95, welches hochaufgelöste kontrastreiche Bilder ermöglicht. Das System war mit einem Ti:Sa Laser (Titanium Sapphire Mai Tai, Spectra Physics, Darmstadt, Deutschland), der ein Wellenspektrum von 700-1000 nm abdeckt, ausgestattet. Zusätzlich kann man mittels OPO, einem sogenannten optisch-parametrischen Oszillator, die Anregungswellenlänge im Infrarotbereich (1100- 1600 nm) erweitern. Dadurch kann man Fluorophore mit weitgehend unterschiedlichen Exzitations- und Emissionsspektren darstellen. Die Bilder wurden bei einer Anregung von 800 nm in einem Bildausschnitt von bis zu 500 x 500 und 512 x 512 Pixel aufgenommen. Bei Videoaufnahmen über längere Zeiträume wurden Wartezeiten von 10 bis 30 Sekunden zwischen jedem Bild eingelegt. Durch mehrere horizontale Schnittbilder durch das Gewebe konnten so genannte Stapel (Stacks) an Bilder erstellt werden, die anschließend zu einem dreidimensionalen Bild mittels der Software Imaris zusammengestellt werden konnten.

6.3. Epifluoreszenzmikroskopie

Für die hier beschriebenen Versuche des Cremaster-Modells (IV.6.4.2) wurde ein Axio Scope A1 Mikroskop (Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany) verwendet, das mit einer Colibri 2 LED Lichtquelle (Zeiss MicroImaging GmbH) ausgestattet war. Die Aufnahmen wurden mit einer AxioCamMRm Digitalkamera aufgenommen und ein QUAD Filterset (QUADDAPI/FITC/Cy3/Cy5 sbx HC filter set; AHF Analysentechnik AG) zusammen mit einem 20x Wasser-Immersion-Objektiv (Zeiss MicroImaging GmbH) wurde verwendet. Die Bilder wurden mit der Axio Vision Software (Zeiss MicroImaging GmbH) anschließend analysiert.

6.4. Modelle zur Intravitalmikroskopie

6.4.1. Ohrmodell

Das Ohrmodell ist ein sehr gut geeignetes Modell, um Prozesse auf Zellebene in der Mikrozirkulation zu analysieren. Etabliert wurde das Ohrmodell bereits von Ng et al. (137) und Roediger et al. (138) und hat sich über die Jahre als klassisches Modell etabliert, um *in vivo*-Untersuchungen der Mikrozirkulation vorzunehmen. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit wurde das modifizierte Modell nach Stark et al. (139) verwendet. Dabei wurde ein Hautfenster an der ventralen Ohrfläche frei präpariert. Das Ohr ist weitgehend frei von den Bewegungsartefakten, die durch Atembewegungen während der Aufnahmen entstehen können, und gilt daher als sehr stabil.

Während der kompletten Präparation befand sich die Stage, worauf die Maus gelagert wurde, auf einer Wärmematte (ThermoLux-Wärmematte, Fa. Dehner, Rain (Lech)), um so die Körpertemperatur des Tieres aufrecht zu erhalten. Nach erfolgter Anästhesie wurde das Tier in Rückenlage gebracht und an den Gliedmaßen mit Klebestreifen (Transpore, 3M health Care, Neuss) an der Stage fixiert. Zur Fixation des Ohrs wurden in L-form gebogene Spitzen einer 30G-Kanüle (BD Microlane TM 3, becton Dickinson and Company Limited, Drogheda, Louth, Irland) verwendet. Das Ohr wurde mit vier bis fünf Nadelspitzen an der Stage fixiert, die ventrale Oberfläche des Ohres befand sich dabei nach oben gerichtet. Für die *in vivo*-Aufnahmen mit dem 2-Photonen-Mikroskop ist eine äußerst gute Stabilität des zu untersuchenden Gewebes erforderlich, die durch die Fixation des Ohres an der Stage bestmöglich erreicht werden konnte.

Nach erfolgter Fixation wurde mit Hilfe einer Stereolupe (Stemi 2000, Zeiss, Jena) unter Ausleuchtung durch eine Schwanenhalslampe (Schott Kaltlichtquelle KL200, Schwanenhals-Lichtleiter, Zeiss, Jena) das Ohr nach geeigneten Gefäßen untersucht. Es wurde ein zirka 3 mm x 3 mm großes Fenster freipräpariert um das gewünschte Gefäß freizulegen. Dazu wurde zunächst mit Hilfe eines Skalpells in genügend großem Abstand zu dem darunterliegenden Gefäß eine zirka 3 mm lange Inzision der Epidermis (Oberhaut) gesetzt. Mittels mikrochirurgischem Bestecks wurde

nun stumpf eine Tasche in Richtung der Blutgefäße präpariert, wobei das Gewebe der Dermis (Lederhaut) von dem Fettgewebe der Subcutis (Unterhaut) getrennt wurde. Unter dem Fettgewebe kommen direkt die Gefäße sowie Nerven der Subcutis zu liegen. Das Fettgewebe wurde vorsichtig abgetragen. Mit einer mikrochirurgischen Schere wurde in die jeweiligen Seitenränder der vorgefertigten Tasche eingegangen um die Hautschichten zu durchtrennen. Der Hautlappen konnte nun umgeklappt werden und an der Oberseite durch einen Schnitt abgesetzt werden. Die Gefäße kamen dadurch frei zu liegen.

Über den Schwanzvenenkatheter wurden fluoreszierende Farbstoffe wie Rhodamin G6 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) zur Markierung von Leukozyten und AF 488 konjugiertes Fibrin(ogen) (Fibrin(ogen) from human plasma, Alexa Fluor 488 conjugate, Life Technologies, USA) sowie von einem Spendertier isolierte und gefärbte Thrombozyten injiziert.

Nach erfolgter Präparation und Gabe der Fluoreszenzfarbstoffe, wurde unter dem Mikroskop eine Verletzung des Gefäßes mittels einer 30G Kanüle gesetzt. Blut wurde vorsichtig mit Wattestäbchen (Wattestäbchen, Noba Verbandmittel Danz GmbH, Wetter) entfernt und wieder mit 0,9 %-NaCl benetzt.

Nach Verabreichung der fluoreszenzmarkierten Zellen über den Schwanzvenenkatheter wurde die Stage mit der Maus vorsichtig zum Mikroskop gebracht und auf dem Tisch platziert. Dieser Tisch befand sich in einer beheizten Kammer, wodurch die Körpertemperatur des Tieres aufrechterhalten werden konnte.

In diesem Modell wurden männliche und weibliche C57BL/6J-Tiere verwendet (12 Tiere).

Das Versuchsvorhaben wurde von der Regierung Oberbayerns gemäß §7 des Deutschen Tierschutzgesetzes (Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 4 Absatz 87 des Gesetzes vom 18. Juli 2016 (BGBl. I S. 1666) geändert worden ist) genehmigt (Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-23-12).

6.4.2. Cremastermodell

Für dieses Modell eignen sich am besten junge Tiere im Alter von 8 bis 12 Wochen. Bei älteren Tieren ist die Verwachsung des *M. cremasters* mit dem umliegenden Gewebe deutlich stärker und erschwert daher die Präparation. Die Präparation wurde mit Hilfe eines Operationsmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland, 42-fache Vergrößerung) durchgeführt und erfolgte mit kleinen Änderungen nach der Erstbeschreibung von Baez (140, 141).

Das Tier wurde auf einer beheizten Unterlage in Rückenlage gebracht und mit Klebebändern an den Gliedmaßen fixiert. Durch leichten Druck auf das untere Abdomen wurden die Hoden in das *Scrotum* vorverlagert und in Position gebracht. Im Bereich der *Raphe scroti* wurde ventral des *Scrotums* ein Schnitt durch die Haut gesetzt um das *Scrotum* zu eröffnen. Einer der beiden Hoden wurde aus dem Skrotum vorgelagert und stumpf von Faszien befreit. Der *Musculus cremaster* wurde an seinem distalen Ende gefasst und an der dafür vorgesehenen Stage mit einer in „L-Form“ gebogenen, sterilen Nadel befestigt. Um Blutungen zu vermeiden wurde median eine Linie entlang des *M. cremasters* mittels einer bipolaren Pinzette kauterisiert und durch eine longitudinale Inzision eröffnet. Der *Musculus cremaster* ist mit dem Nebenhoden durch das *Ligamentum testis proprium* und des Weiteren über das *Ligamentum caudae epididymidis* mit dem *Scrotum* verbunden. Von diesem wurde der *M. cremaster* vorsichtig getrennt. Anschließend wurden die Ränder der Inzision des *M. cremasters* an der Stage mit den in „L-Form“ gebogenen sterilen Nadeln unter leichter Spannung befestigt. Der Hoden wurde wieder zurück in die Bauchhöhle verlagert beziehungsweise eine Orchiektomie konnte durchgeführt werden. Während der Präparation und des Versuches wird der *Musculus cremaster* mit einer thermokontrollierten (37 °C) Bikarbonat-gepufferten Lösung superfundiert.

In diesem Modell wurden männliche C57BL/6J-Tiere verwendet (12 Tiere).

Das Versuchsvorhaben wurde von der Regierung Oberbayerns gemäß §7 des Deutschen Tierschutzgesetzes (Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 4 Absatz 87 des Gesetzes vom 18. Juli 2016 (BGBl. I S.

1666) geändert worden ist) genehmigt (Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-23-12).

6.4.2.1. Stimulation des *M. cremaster* durch intraskrotale Injektion

Vorab erfolgte eine intraskrotale Injektion von 20 ng LPS (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O55:B5, Sigma-Aldrich, Missouri, USA), um eine Inflammation des Gewebes zu erreichen. Zur Vorbereitung der intraskrotalen Injektion wurde das Versuchstier kurzzeitig mittels Isofluran narkotisiert und die zu applizierende Substanz gelöst in 200 µl NaCl mit einer feinen Kanüle (30G) intraskrotal injiziert. Nach Wiedererwachen der Tiere wurden diese separat eingesetzt und hatten bis zur chirurgischen Präparation freien Zugang zu Wasser und Futter.

6.4.3. Lebermodell

Die Narkose wurde wie oben beschrieben eingeleitet und das Operationsfeld vorbereitet. Dazu wurde die Maus auf der dafür vorgesehenen Stage in Rückenlage mit Klebestreifen an den Gliedmaßen fixiert und im Bereich des Abdomens die Enthaarungscreme (asid-med, AsidBonzGmbH, Herrenberg) aufgetragen. Das Operationsfeld reichte dabei vom Xyphoid bis zum unteren Drittel des Abdomens. Nach einem Hautschnitt in der Medianen wurden die Muskelschichten in der *Linea alba* durchtrennt und das Peritoneum eröffnet. Im kranialen Abdomen wurden zwei laterale Entlastungsschnitte gesetzt. Lateral der Maus wurde eine mit 0,9 %-NaCl befeuchtete Gaze (Mullkompressen, NOBA Verbandmittel Danz GmbH, Wetter) vorbereitet. Mit in 0,9 %-NaCl getränkten Wattestäbchen (Wattestäbchen, Noba Verbandmittel Danz GmbH, Wetter) wurde das Darmkonvolut vorsichtig nach lateral vorverlagert und auf die Gaze verbracht. Zum Schutz vor Austrocknung wurde das Konvolut mit einer zweiten Gaze bedeckt und mit NaCl feucht gehalten.

Die speziell für das Lebermodell angefertigte Stage besteht aus zwei an Stativen angebrachten „Metallstäben“, an deren vorderem Teil sich ein Metallkreis befindet, der als Auflage für ein Plastikplättchen beziehungsweise eines runden Deckglases an dem oberen Stab, dient. Um eine bessere Vorverlagerung des Organs und weniger Beeinflussung durch Atembewegungen und damit mehr Stabilität beim *in vivo*-Imaging zu

erreichen, wurde das *Ligamentum falciforme*, welches die Leber an der Unterfläche des Zwerchfells fixiert (142), durchtrennt. Auf das untere Plastikplättchen wurde Gewebekleber (1x Histoacryl, B. Braun Surgical SA, Rubí, Spanien) aufgetragen und einer der kaudalen Leberlappen vorsichtig mit Hilfe zweier mit 0,9 %-NaCl befeuchteten Wattestäbchen vorgelagert und darauf fixiert. Anschließend wurde der obere Stab mit dem Deckglas an der ventralen Oberfläche des nun hervorgelagerten Leberlappens positioniert. Dabei wurde auf einen minimalen Kontakt durch das Deckglas mit dem Leberparenchym geachtet, um einen physiologischen Blutfluss zu gewährleisten. Anschließend erfolgte das *in vivo*-Imaging mittels 2-Photonen-Mikroskops, wobei sich die Stage mit der Maus in einer Wärmekammer befand. Das durch den Metallring begrenzte Deckglas wurde mit einigen Tropfen destilliertem Wasser oder 0,9 %-NaCl befüllt, um so die mikroskopische Ebene einstellen zu können und eine ideale Stelle mit gutem Durchfluss aufsuchen zu können. In diesem Modell wurden die Mauslinie Rosa26mT/mGxPf4Cre (3 Tiere) (IV.1.2), bei der Thrombozyten grün fluoreszieren, sowie C57BL/6J-Tiere verwendet (6 Tiere).

Das Versuchsvorhaben wurde von der Regierung Oberbayerns gemäß §7 des Deutschen Tierschutzgesetzes (Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 4 Absatz 87 des Gesetzes vom 18. Juli 2016 (BGBl. I S. 1666) geändert worden ist) genehmigt (Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-190-2015).

7. Sepsis-Modell

In dem Sepsis-Modell wurden CD41YFP^{ki/ki}-Mäuse verwendet, wobei C57BL/6J als Kontrolltiere dienten (n = 4 pro Versuchsgruppe), sowie Mäuse mit MYH9-defizienten Thrombozyten (PF4-Cre x MYH9^{fl/fl}-Chimären; n = 6).

Über die Schwanzvene wurden $3,2 \times 10^8$ Bakterien (siehe oben IV.4.1) in einem Gesamtvolumen von 200 µl 0,9 %-NaCl (Isotonische Kochsalzlösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) am wachen Tier intravenös appliziert. Den Kontrolltieren wurde ein identisches Volumen an

0,9 %-NaCl verabreicht.

Nach den jeweiligen Zeitpunkten (1 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h) erfolgte die Narkotisierung der Tiere mit anschließender intrakardialer Blutentnahme (siehe oben IV.5.1). Bis dahin standen die Tiere unter engmaschiger Beobachtung. Die Tiere wurden dazu in einem Tierhaltungsschrank (Ventilated Cabinet, Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) untergebracht und Allgemeinbefinden, Nahrungsaufnahme, Bewegungsaktivität, Verhalten sowie Harn- und Kotabsatz anhand von Score-Sheets in genau festgelegten Zeitabständen kontrolliert und notiert. Abbruchkriterien wurden hierbei anhand der aufgeführten Parameter, die mit Hilfe eines Punktesystems (Score 0-2) bewertet wurden, streng definiert. Bei mehrmaliger (mehr als zweimal in Folge) Vergabe von Score-1 oder einmaligem Auftreten von Score-2 musste der Versuch sofort abgebrochen werden.

Score System Versuchsreihe 3				Tag1									Tag2
Sepsismodell nach Injektion von NaCl, LPS bzw. E.coli				SZP1	SZP2	SZP3	SZP4	SZP5	SZP6	SZP7	SZP8	SZP9	
Scorezeitpunkt (SZP)				08:00	10:00	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	08:00	
Uhrzeit				0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	24h	
Zeitpunkt nach Injektion													
Parameter	Score 0	Score 1	Score 2										
Allgem. Befinden	gut (normale Aktivitäten, z.B. Fressen, Ruhen, Bewegen)	vermindert (gewölbter Rücken, gestäubtes Fell, bewegt sich verlangsamt)	stark vermindert (dehydriert, apathisch, kühle Körperoberfläche, flache oder Pumpatmung, Schwellungen, kachektisch, verklebte Augen)										
Nahrungsaufnahme	Tiere fressen, (Körpergewicht erhalten)	verminderte Nahrungsaufnahme < 24h (Körpergewicht vermindert)	verminderte Nahrungsaufnahme > 24h (Körpergewicht vermindert)										
Bewegungsaktivität	umherlaufen, klettern an den Gitterstäben	zurückgezogen (hockt in der Ecke), schläfrig	liegt bewegungslos > 24h										
Verhalten	Nestbau, interessiert an der Umgebung, munter	Desinteresse an der Umgebung	Automutilation oder Apathisch, abgesondert										
Kotabsatz	normal	Durchfall < 24h	Blutung oder Durchfall aus dem Rektum > 24h oder fehlender Kotabsatz, Rektumprolaps										
Harnabsatz	normal	ggr. blutiger Harn	fehlender Harnabsatz										
Körpergewicht in g													
Gesamtscore													

Abbruchkriterien: bei Score 2 oder mindestens drei Mal hintereinander Score 1

** erstellt in Anlehnung an den Vortrag von PD Dr. med. vet. DipeCLAM Margarete Arras "Abbruchkriterien aus wissenschaftlicher Sicht" bei der 2. Fortbildungsveranstaltung für Tierschutzbeauftragte Berlin, 28. Mai 2009

Abbildung 5: Score Sheet

Anhand dieses Score Sheets wurden die Tiere über einen Zeitraum von 24h überwacht. Dabei wurden für die aufgeführten Parameter zu den jeweiligen Score-Zeitpunkten (SZP) für die Score-Bewertungen eingetragen und der Gesamtscore ermittelt. Als Abbruchkriterium wurde einmaliges Auftreten von Score 2 bzw. dreimalige hintereinander auftretender Score 1 festgelegt.

Score Sheet, Anlage aus dem Tierversuchsantrag AZ.:55.2-1-54-2532-197-13, genehmigt durch die Regierung von Oberbayern am 25.02.2014

Nach der Blutentnahme wurde die Maus mittels zervikokranieler Dislokation euthanasiert. Anschließend wurde das Abdomen mit einem Hautantiseptikum (Octanisept, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) benetzt, um so eine Kontamination der Bauchhöhle durch Haare in der anschließenden Eröffnung der Bauchhöhle und Entnahme der Organe möglichst zu vermeiden. Das Darmkonvolut wurde vorverlagert und Leber sowie Milz nacheinander freipräpariert und entnommen. Dabei wurden jeweils zirka 0,5 cm x 0,5 cm große Stücke der Leber entnommen und in mit Tissue-Tek (Tissue-Tek O.C.T Compound, SakuraFinetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande) befüllte Schälchen (Tissue-Tek Cryomold, 15 mm x 15 mm x 5 mm, Satura Finelek, USA) eingebettet und auf Trockeneis schockgefroren. Ebenso wurde die Milz in zwei Teilen eingefroren. Die Lunge wurde vor Entnahme mit 4 %igem-Formaldehyd (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA) perfundiert. Dazu wurde der Brustkorb eröffnet, umso direkten Zugang zum Herzen zu bekommen. Mit einer 26G-Kanüle (BD Microlane 3, Becton Dickinson and Company Limited, Drogheda, Louth, Irland) wurde in die rechte Herzkammer eingegangen und mit einer 5 ml-Spritze (B. Braun, Melsungen) bis zum Aufblähen der Lunge mit 4 %igem Formaldehyd gespült. Bis zur Anfertigung der histologischen Schnitte, wurden die in Tissue-Tek gebetteten Organe bei -80 °C aufbewahrt.

Aus dem intrakardial entnommenen Blut wurde Plasma gewonnen. Anschließend wurde ein ELISA zur Bestimmung von IL-6, sowie Kits zur Bestimmung der Leberenzyme AST bzw. ALT, durchgeführt.

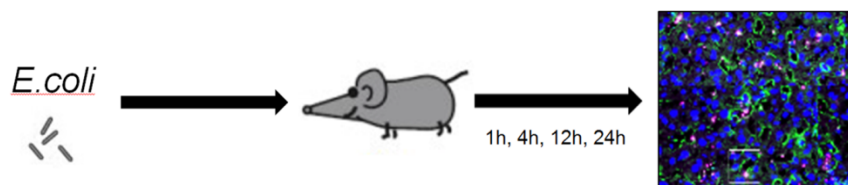


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Sepsis-Modells

Durch Injektion von $3,2 \times 10^8$ *E. coli* über die Schwanzvene wurden die Tiere in dem Sepsis-Modell infiziert. Anschließend standen die Tiere unter Beobachtung (siehe Abbildung 5, Score Sheet). Zu dem jeweiligen Endzeitpunkt des Versuchs (1 h, 4 h, 12 h, 24 h) wurde den Tieren intrakardial Blut entnommen und immunhistologische Schnitte der Leber angefertigt.

Das Versuchsvorhaben wurde von der Regierung Oberbayerns gemäß §7 des Deutschen Tierschutzgesetzes (Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 4 Absatz 87 des Gesetzes vom 18. Juli 2016 (BGBl. I S. 1666) geändert worden ist) genehmigt (Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-197-13).

7.1. Anzucht von Bakterien

Als Bakterium wurde *E. coli* (110) verwendet (*E. coli* Subtyp: strainDH12, transformiert mit einem tdTomato-Expressionsplasmid), die als Glycerol-Stock bei -80 °C gelagert wurden.

Zum Ansetzen einer Übernacht-Kultur wurden 5 ml LB-Medium (LB Broth (Luria Iow salt) Powder microbial growth medium, Sigma Aldrich, Steinheim) sowie 1 mM IPTG (1:100 IPTG, Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; Sigma Aldrich Chemie, Steinheim) und 100 μ M Ampicillin (1:1000 Ampicillin sodium salt, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim) in ein belüftbares Rundbodenröhrchen (14 ml Rundbodenröhrchen, Polypropylen; FALCON Corning Incorporated, Corning, NY, USA) verbracht. Der in einem Kryoröhrchentief-gefrorene Bakterien-Stock wurde im Bereich einer heißen Bunsenbrenner-Flamme an der gefrorenen Oberfläche mit einer sterilen Einmal-Impföse (VWR) angekratzt und angeimpft. Das Röhrchen wurde anschließend bei 37 °C und 260 rpm (Umdrehungen pro Minute) in einem Inkubationsschüttler (Lab-Therm/Shaker, Modell Kühner, B.Braun Melsungen AG, Germany) über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden durch eine 1:1000-Verdünnung der gesättigten Übernachtskultur eine Starterkultur in einem Erlenmeyerkolben mit 50 ml LB-Medium, 1 mM IPTG und 100 μ M Ampicillin angelegt. Diese wurde bei 37 °C und 250 rpm für 2,5 Stunden geschüttelt. Das Wachstum der Bakterien wurde anhand der Messung der optischen Dichte bei 600 nm mittels eines Spektrophotometers (BioPhotometer 6131, Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Anhand einer aus Wachstumskurven ermittelten Formel für die exponentielle Wachstumsphase des Bakterienstamms wurde die benötigte Menge aus der angeimpften Kultur berechnet, um ein Injektionsvolumen von 100 μ l pro Tier mit einer Konzentration von $3,2 \times 10^8$ Bakterien zu erhalten. Die

berechnete Menge der Bakteriensuspension, die die benötigte Bakterienzahl enthielt, wurde in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 4 °C und 2500 xg zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde nach dem ersten Zentrifugationsschritt abgenommen und das Bakterienpellet in dem gewünschten Volumen mit 0,9 %-NaCl (Isotonische Kochsalzlösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) resuspendiert und anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß (Eppendorf Tubes, Eppendorf AG, Hamburg) überführt. Dieses wurde ein weiteres Mal (Centrifuge 5424R, Eppendorf, Hamburg) bei 4 °C und 4000 xg für 10 Minuten zentrifugiert und das Bakterienpellet erneut mit 0,9 %-NaCl-Lösung resuspendiert um ein Endvolumen von 100 µl mit einer Endkonzentration von $3,2 \times 10^8$ Bakterien pro Tier zu erhalten. Bis zur Injektion wurden die Bakterien bei 4 °C gelagert, um weiteres Wachstum zu verhindern.

7.2. CFUs (Colony Forming Units)

Zu Beginn unserer Versuchsreihen wurden Leber, Lunge sowie Vollblut nach Ablauf des Sepsis-Versuches (Verweis auf Sepsis-Modell) entnommen und mit einer Feinwaage (Kern ABJ, Kern&Sohn GmbH, Balingen) gewogen und in mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA) befüllten Petrischalen (Greiner Bio-One GmbH, Österreich) auf Eis aufbewahrt. Anschließend wurden die Organe homogenisiert. Dazu wurden die Organe mit dem Stempel einer 10 ml-Spritze (B. Braun, Melsungen) vorsichtig durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 µm (Cellstrainer, B&D) mit kreisenden Bewegungen gedrückt und in einem Zentrifugationsröhrchen aufgefangen. Die Organe beziehungsweise das Vollblut wurde anschließend in folgenden Verdünnungen steril auf Agar-Platten ausgestrichen (Tabelle 1). Nach 6 Stunden wurden die CFUs (Colony Forming Units) auf den Platten ausgezählt und für das jeweilige Organ berechnet.

Tabelle 1: Verdünnungen der auf Agar-Platten ausgestrichenen Organe bzw. Blut

Leber		Milz		Blut	
1: 10 000	1:100 000	1:1000	1:10 000	unverdünnt	1:10

7.3. Agar-Platten

Zum Gießen der Agar-Platten wurde ein 500 ml Kolben mit 7,5 g bakteriologischem Agar (Bacteriological Agar for Molecularbiology, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 7,75 g LB-Medium (LB Broth (Luria lowsalt) Powder microbial growth medium, Sigma Aldrich, Steinheim) mit 500 ml Reinstwasser aus einer MilliQ Advantage A10-Anlage vorbereitet und anschließend autoklaviert. Nach dem Autoklaviervorgang wurde das Plattenmedium auf 57 °C im Wasserbad abgekühlt und anschließend unter einer Sterilbank nach Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin in die Petrischalen (Greiner Bio-One GmbH, Österreich) gegossen.

7.4. Bestimmung von IL-6 und ALT/AST im Plasma

7.4.1. Probengewinnung

Aus zirka 500 µl des entnommenen Blutes konnten 300 µl Plasma gewonnen werden. In einer 2 ml-Spritze (BD Discardit, Becton Dickinson S.A., Fraga, Huesca, Spanien) wurden 0,6 µl Heparin (Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm, 5 ml, Ratiopharm GmbH (25 000 I.E)) in 149,4 µl Tyrodes pH 7,5 vorgelegt und intrakardial Blut entnommen (siehe oben IV.5.1). Das gewonnene Blut wurde in 1,5 ml Eppendorf-Tubes verbracht und bei 4 °C, 1500 xg für 15 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Plasma abgenommen und in jeweils 100 µl in 0,5 ml Eppendorf-Tubes aliquotiert und auf Trockeneis verbracht. Die Plasmaproben wurden bei -80 °C gelagert.

7.4.2. IL6-ELISA

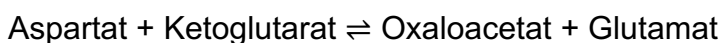
Zur Bestimmung des IL-6-Gehalts im gewonnenen Plasma wurde ein kommerziell verfügbares Kit der Firma Abcam (Firma Abcam (Interleukin-6 Mouse ELISA Kit, Abcam) verwendet. Die bei -80 °C gelagerten Plasmaproben wurden auf Eis langsam aufgetaut. In der Zwischenzeit wurden die Reagenzien (Standards) des Kits vorbereitet. Anschließend wurden die Wells mit jeweils 100 µl der Probe beschickt, wobei die ersten beiden Reihen der 96-Well-Platte für die Verdünnungsreihe des IL-6-Standard zur Erstellung einer Standardgeraden dienten. Die 96-Well-Platte wurde bei 4 °C über Nacht auf einem Rüttler inkubiert (Type: Reax 3, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach). Am nächsten

Morgen erfolgte mit Hilfe einer Multi-Kanal-Pipette ein viermaliges Waschen mit der Waschlösung. Nach dem vierten Waschen wird durch kräftiges Klopfen auf ein Papiertuch restlicher Waschpuffer entfernt. Im nächsten Schritt wurden 100 µl des biotinylierten IL-6 Detektionsantikörpers in jedes der Wells pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung verworfen und es folgte erneut ein 4-maliges Waschen (wie zuvor beschrieben). Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl HRP-Streptavidin (horseradish-peroxidase-Streptavidin) und eine Inkubationszeit von 45 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Abermals wurde die Lösung verworfen und viermaliges Waschen durchgeführt. Nach erfolgtem kräftigem Abklopfen wurden 100 µl TMB One-Step-Substrat in die Wells pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach der abgelaufenen Zeit wurde mit 50 µl Stopp-Solution die Reaktion gestoppt. Am Photometer konnten bei einer Wellenlänge von 450 nm die Proben ausgelesen werden.

7.4.3. AST und ALT Kit

7.4.3.1. Aspartataminotransferase (AST)

Bei der Aspartataminotransferase (AST) handelt es sich um eine Transaminase, die als klinischer Parameter beim Leber-Funktionstest herangezogen wird. Diese Transaminase katalysiert folgende Reaktion:



Das verwendete Kit (Aspartate Aminotransferase Activity Colorimetric Assay Kit, BioVision; Milpitas, USA) funktioniert nach folgendem Prinzip:

Eine Aminogruppe wird von Aspartat auf Ketoglutarat übertragen. Die Endprodukte dieser Transaminierungsreaktion sind Oxalacetat und Glutamat. Glutamat wird durch den die Reaktion begleitenden Farbumschlag in einem Spektrophotometer detektiert ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$).

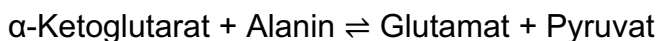
Arbeitsablauf: Zunächst wurde zur Erstellung der Standardkurve eine Standardreihe an Glutamat angesetzt. Zeitgleich wurden die Plasmaproben aufgetaut und anschließend in die bereits mit 50 µl Assay Puffer beschickten Wells überführt.

Parallel wird ein Reaktions-Mix angesetzt. Dieser setzt sich pro Well wie folgt zusammen: 80 µl AST Assay Puffer, 2 AST Enzym-Mix, 8 µl Entwickler, 10 µl AST-Substrat. Anschließend wurden je 100 µl des Reaktions-Mixes in jedes der Wells (Well mit enthaltenen Probe, Standard und Positivkontrolle) hinzugegeben und gut durchmischt.

Nach mindestens 10 Minuten (T1) wurde bei einer OD 450 nm zum ersten Mal gemessen und nach einer Inkubationszeit von mindestens 60 Minuten bei 37 °C erneut eine Messung am Photometer durchgeführt und die AST Aktivität berechnet.

7.4.3.2. Alaninaminotransferase (ALT)

Die Alaninaminotransferase (ALT) ist ebenfalls eine Transaminase und ist sehr spezifisch für die Leber. Sie katalysiert folgende Reaktion:



Das verwendete ALT-Kit (Alaninaminotransferase Activity Colorimetric/Fluorometric Assay Kit, BioVision; Milpitas, USA) funktioniert nach folgendem Prinzip:

ALT katalysiert die Abgabe einer Aminogruppe von Alanin zu α -Ketoglutarat. Die Endprodukte dieser reversiblen Reaktion sind Glutamat und Pyruvat. Pyruvat kann dann durch einen Farbumschlag mittels Photometer ($\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}$) beziehungsweise durch Messung der Fluoreszenz ($\text{Ex/Em} = 535/587 \text{ nm}$) detektiert werden.

Der Arbeitsablauf erfolgt homolog zu dem oben beschriebenen AST-Kit (7.4.3.1).

8. Immunhistologie

In den frühen 1940er Jahren entwickelte Albert Coons eine Technik, um Antikörper mit fluoreszierenden Farbstoffen zu markieren (143). Über die Jahre konnte die Methode verbessert werden und so eine möglichst hohe

Sensitivität und möglichst wenig Hintergrund in den mikroskopischen Aufnahmen erreicht werden. Mittlerweile findet diese Methode weitverbreitete Anwendung. Obwohl das Prinzip der Immunhistochemie gut anwendbar ist, ist anzumerken, dass das Protokoll bei jeder neuen Antikörper-Kombination beziehungsweise Anwendung in einem neuen Gewebe anzupassen ist und neu etabliert werden muss.

Zur Beurteilung von Verteilung und Quantität von Bakterien und Thrombozyten sowie von Fibrin(ogen) in der Leber wurden in dieser Arbeit nach folgendem Protokoll vorgegangen und die angeführten Färbungen etabliert. Nach der Färbung erfolgten Aufnahmen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.M2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) und anschließend eine Auswertung mit Imaris 8.2 (Bitplane AG, Badenerstraße 683, Zürich, Schweiz).

8.1. Anfertigung histologischer Schnitte

Die in Tissue-Tek (Tissue-Tek O.C.T Compound, Sakura Finetek Europe B.V., Alphenaan den Rijn, Niederlande) eingebetteten Leberstücke wurden bei -80 °C gelagert.

Zur Anfertigung der histologischen Schnitte wurde ein Kryotom (CryoStar NX70 Kryostat) verwendet. Zunächst wurde das Präparat in der Kammer des Kryotoms bei -20 °C auf einem Stempel mit Tissue-Tek fixiert und eingebettet. Sobald das Tissue-Tek ausreichend gefroren war, konnte das Präparat mit dem Stempel in die dafür vorgesehen Vorrichtung eingespannt werden. Die Temperatur des Stempels wurde auf -14 °C und die des Messers auf -18 °C eingestellt. Zunächst wurde das Präparat bis zum Erreichen des Organs angeschnitten. Das erfolgte in 30 µm-Schritten in einem automatischen Schneidemodus. Mit Erreichen des Organs wurde auf den manuellen Modus gewechselt und 5 µm dicke Schnitte auf einen Adhäsions-Objektträger (Thermo Scientific, Superfrost Plus, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) vorsichtig aufgenommen. Bis zur Färbung wurden die Objektträger bei -20 °C in histologischen Boxen aufbewahrt.

8.2. Immunhistologische Färbung

Die gesamte Färbung erfolgte in einer Färbekammer, die mit Wasser befüllt war, um so die Schnitte vor dem Austrocknen während des

Färbeprozesses zu bewahren. Vor Beginn der Färbung wurden die Präparate mit einem Fettstift (Dako Pen, Dako Deutschland GmbH, Hamburg) umfahren, um so ein Auslaufen der aufgetragenen Lösungen zu verhindern. Anschließend erfolgte eine Fixation des Präparats für drei Minuten mit 4 %igem Formaldehyd (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA). In Glasküvetten wurden die Objektträger dreimal für jeweils 5 Minuten in einer PBS (Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA) -0,1 %Tween (Tween 20, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)-Waschlösung gewaschen. Anschließend erfolgt das Blocken von unspezifischen Bindungsstellen mit Goat-Serum (5 %) (Normal goatserum ready-to-use, Invitrogen Cooperation, Frederick, MD, USA) beziehungsweise Donkey Serum (10 %) (Donkey Serum, Sigma Aldrich, Missouri, USA) über 30 Minuten bei Raumtemperatur. Das Serum wurde vorsichtig abgeklopft und es folgte das Auftragen des jeweiligen primären Antikörpers in der gewünschten Konzentration (Tabelle 2, Tabelle 3, Tabelle 4) für mindestens eine Stunde. Nach der Inkubationszeit mit dem primären Antikörper erfolgte wieder ein dreimaliges Waschen für 5 Minuten in der PBS-Tween-Waschlösung. Danach wurde der Sekundär-Antikörper aufgetragen (1:200) und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte abgeklopft und für drei Minuten mit HOECHST (1:1000) (Hoechst 33342 trihydrochloridetrihydrate, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) zur Zellkernfärbung versehen. Es folgte ein letzter Waschschriff mit der gleichen Vorgehensweise wie davor beschrieben. Als letzter Schriff wurde der Objektträger mit einigen Tropfen Eindeckmedium (Dako Fluorescent Mounting Medium, Dako North America, Inc., Carpintera, CA, USA) versehen und mit einem Deckglas (MEDITE GmbH, Burgdorf) versehen. Bis zu den Aufnahmen mit dem Mikroskop (Axio Imager.M2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) wurden die Schnitte in Münchner Mappen bei 4 °C aufbewahrt.

Parallel wurde eine Isotypkontrolle mit einem Antikörper der gleichen IgG-Klasse, der gegen ein irrelevantes Antigen gerichtet war durchgeführt.

Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle, bei der lediglich der Sekundärantikörper aufgetragen wurde, durchgeführt.

8.2.1. CD42b-O&K-Doppelfärbung

Es wurde bei dieser Doppelfärbung wie in dem oben beschriebenen Protokoll (8.2) vorgegangen. Nach Fixation und Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit Goat Serum wurden die gegen das jeweilige Antigen gerichteten Primär-Antikörper aufgetragen. Dabei wurde zur Anfärbung der Thrombozyten das Antigen CD42b (Purified Rat Anti-Mouse GPIIb (Cd42b) Monoclonal Antibody M043-0, 0,5 mg/ml, Emfret Analytics, Würzburg) mit einer Verdünnung des Primärantikörpers von 1:50 markiert. Um die Lipopolysaccharide der äußeren Membran der gramnegativen Bakterien anzufärben, wurde ein Antikörper gegen die O&K-Antigene eingesetzt (*E. coli* serotypes O + K Polyclonal Rabbit Antibody, 4-5 mg/ml, ThermoFischer ehemals Life Technologies (1:100 verdünnt)). Dabei handelt es sich um einen Antikörper der gegen die O- und K-Antigene der Lipopolysaccharidseitenketten gerichtet ist. Nach dem Waschschrift wurden die Objektträger mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern beschickt. Dabei wurde ein Alexa Fluor 488 konjugierter Sekundärantikörper (Goat Anti-Rat IgG H&L (Alexa Fluor 488), Life Technologies, USA) eingesetzt, um den Antikörper, der gegen die Thrombozyten gerichtet war, zu markieren und ein Alexa Fluor 594 konjugierter (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 594), Life Technologies, USA), um die Bakterien darzustellen.

Für die Isotypkontrolle von CD42b wurde IgG2a aus der Ratte (Rat IgG2a IsoControl, Clone eBR2a, 5 mg/ml, eBioscience) und für die des O&K-Antikörpers ein IgG aus dem Kaninchen verwendet (Negative Control Rabbit Immunglobulin 15 g/L, Dako).

Tabelle 2: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper in der Doppelfärbung Thrombozyten/Bakterien

Antigen	<u>Antikörper</u>	Hersteller	Konzentration	Verdünnung
Cd42b	Rat Anti-Mouse M043-0 Monoclonal Antibody	Emfret Analytics	0,5 mg/ml	1:50
O&K	<i>E. coli</i> serotypes Polyclonal Rabbit Antibody	ThermoFischer GmbH	4-5 mg/ml	1:100
Antigen	<u>Sekundär-Antikörper</u>	Hersteller	Konzentration	Verdünnung
Cd42b	Goat Anti-Rat IgG H&L (Alexa Fluor 488)	Life Technologies	2 mg/mL	1:200
O&K	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 594)	Life Technologies	2 mg/ml	1:200

8.2.2. Fibrin(ogen)-CD42b-Doppelfärbung

Bei dieser Doppelfärbung wurde ebenfalls nach dem oben beschriebenen Protokoll (8.2) vorgegangen. Nach Fixation erfolgte jedoch ein Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit Donkey Serum (10 %). Zur Färbung des Fibrin(ogen)s wurde ein Antikörper aus der Spezies Schaf (Sheep Anti Human Fibrin(ogen) Polyclonal Antibody, Purified, 5 mg/ml, AbD Serotec, Puchheim) in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Die Thrombozyten wurden mit dem oben genannten Antikörper (8.2.1) gegen CD42b Antigen (Purified Rat Anti-Mouse GPIb α (Cd42b) Monoclonal Antibody M043-0, 0,5 mg/ml, Emfret Analytics, Würzburg) markiert. Als Sekundärantikörper wurden für Fibrin(ogen) ein AF 594 konjugierter Sekundärantikörper (Donkey Anti-Sheep IgG H&L (Alexa Fluor 594), Life Technologies, USA (1:200)) und für die Detektion der Thrombozyten ein Alexa Fluor 488 konjugierter Sekundärantikörper (Donkey Anti-Rat IgG H&L (Alexa Fluor 488), Life Technologies, USA (1:200)) verwendet.

Für die Isotypkontrolle von Fibrin(ogen) wurde ein Polyklonales Schaf-IgG Polyclonal IgG Sheep (Purified Sheep IgG, 0,2 mg/ml R&D, Minneapolis, USA) eingesetzt und als Kontrolle für den anti CD42b-Antikörper die IgG2a-Isotypkontrolle aus der Ratte (Rat IgG2a IsoControl, Clone eBR2a, 5 mg/ml, eBioscience).

Tabelle 3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper in der Doppelfärbung Thrombozyten/Fibrin(ogen)

Antigen	<u>Antikörper</u>	Hersteller	Konzentration	Verdünnung
Cd42b	Rat Anti-Mouse M043-0 Monoclonal Antibody	Emfret Analytics	0,5 mg/ml	1:50
Fibrin(ogen)	Sheep Anti Human Fibrin(ogen) Polyclonal Antibody	AbD Serotec	5 mg/ml	1:100
Antigen	<u>Sekundär-Antikörper</u>	Hersteller	Konzentration	Verdünnung
Cd42b	Donkey Anti-Rat IgG H&L (Alexa Fluor 488)	Life Technologies	2 mg/ml	1:200
Fibrin(ogen)	Donkey Anti-Sheep IgG H&L (Alexa Fluor 594)	Life Technologies	2 mg/ml	1:200

8.2.3. Fibrin(ogen)-O&K-Doppelfärbung

Diese Doppelfärbung wurde ebenfalls nach dem oben beschriebenen Protokoll (8.2) durchgeführt. Nach Fixation erfolgte ein Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit Donkey Serum (10 %). Zur Färbung des Fibrin(ogen) wurde der bereits erwähnte Antikörper aus der Spezies Schaf (Sheep Anti Human Fibrinogen Polyclonal Antibody, Purified, 5 mg/ml, AbD Serotec, Puchheim) in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Zur Detektion der Bakterien wurde der bereits genannte Antikörper gegen die O&K-Antigene (*E. coli* serotypes O + K Polyclonal Antibody, 4-5 mg/ml, Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany) in einer 1:100 Verdünnung eingesetzt. Als Sekundärantikörper zur Markierung von Fibrin(ogen) wurde ein AF 488 konjugierter (Donkey Anti-Sheep IgG H&L (Alexa Fluor 488), Life Technologies, USA (1:200)) und für die Detektion des O&K-Antigens ein AF 594 konjugierter Sekundärantikörper (Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 594), Life Technologies, USA (1:200)) verwendet. Für die Isotypkontrolle von Fibrin(ogen) wurde ein polyklonales Schaf-IgG (Purified Sheep IgG, 0,2 mg/ml R&D, Minneapolis, USA) eingesetzt und als Kontrolle des O&K-Antigens ein aus dem Kaninchen stammenden IgG verwendet (Negative Control Rabbit Immunglobulin 15g/L, Dako).

Tabelle 4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper in der Doppelfärbung Fibrin(ogen)/Bakterien

Antigen	<u>Antikörper</u>	Hersteller	Konzentration	Verdünnung
O&K	<i>E. coli</i> serotypes Polyclonal Rabbit Antibody	ThermoFischer GmbH	4-5 mg/ml	1:100
Fibrin(ogen)	Sheep Anti Human Fibrin(ogen) Polyclonal Antibody	AbD Serotec	5 mg/ml	1:100
Antigen	<u>Sekundär-Antikörper</u>	Hersteller	Konzentration	Verdünnung
O&K	Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 594)	Life Technologies	2 mg/ml	1:200
Fibrin(ogen)	Donkey Anti-Sheep IgG H&L (Alexa Fluor 488)	Life Technologies	2 mg/ml	1:200

8.3. Aufnahmen der histologischen Immunfluoreszenz-Schnitte

Die fertig gefärbten Schnitte wurden anschließend mit Hilfe eines Mikroskops (AxioImager. M2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) abfotografiert.

Die Aufnahmen wurden unter Einsatz eines Filtersets (GFP/mPlum) und eines 40 x Objektiv (Zeiss MicroImaging GmbH) mit einer AxioCamMRm Digitalkamera aufgenommen. Es wurden Mosaikaufnahmen bestehend aus 6 x 6 Einzelbildern angefertigt. Die Größe eines Mosaikbildes betrug dabei 2049 x 1151 μm (Fläche: $\sim 3,2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). Von jedem Tier wurden zwei Mosaikaufnahmen von histologischen Schnitten verschiedener Leberlappen angefertigt und anhand der Imaris 8.2 Software ausgewertet.

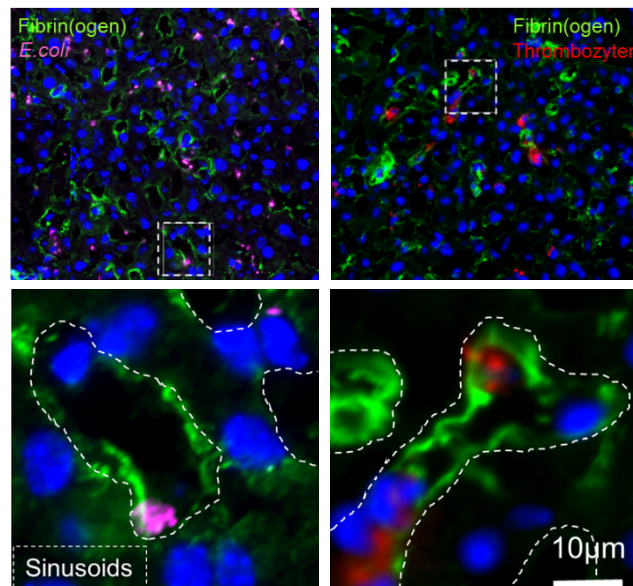


Abbildung 7: Immunhistologische Färbungen der Leber

Gewebeschnitt der Leber nach immunhistologischer Färbung von Fibrin(ogen) = grün, Thrombozyten (CD42b) = rot und *E. coli* (Anti-*E. coli* O&K-Antigen) = magenta, Zellkerne (DAPI) = blau, gestrichelte Linien kennzeichnen die Lebersinusoide.

8.4. Auswertung

Durch Zuhilfenahme der Imaris 8.2 Software (Bitplane AG, Zürich, Schweiz) wurden die abfotografierten histologischen Schnitte ausgewertet. Dabei wurden pro Tier jeweils zwei Mosaikaufnahmen (6 x 6 Einzelbilder) von histologischen Schnitten verschiedener Leberlappen herangezogen und anhand der Imaris 8.2 Software ausgewertet. Um die Zahl, Größe sowie Flächen der Thrombozyten- und Bakterienaggregate in den Schnitten (Fläche: $\sim 3,2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) zu quantifizieren wurden mit Hilfe der „Surface“-Funktion jeweils Flächen für Thrombozyten und Bakterien in den jeweiligen Kanälen erstellt.

Ausgehend von diesen erstellten Flächen konnte mit der „Distance-Transformation“-Funktion der Abstand der Thrombozyten zu den Bakterien ermittelt werden. Im Zuge dessen war es möglich Kolokalisationen von Thrombozyten und Bakterien zu bestimmen. Des Weiteren ermöglichte es uns die Ermittlung der Größe der sich in Kolokalisation befindlichen Bakterienaggregate.

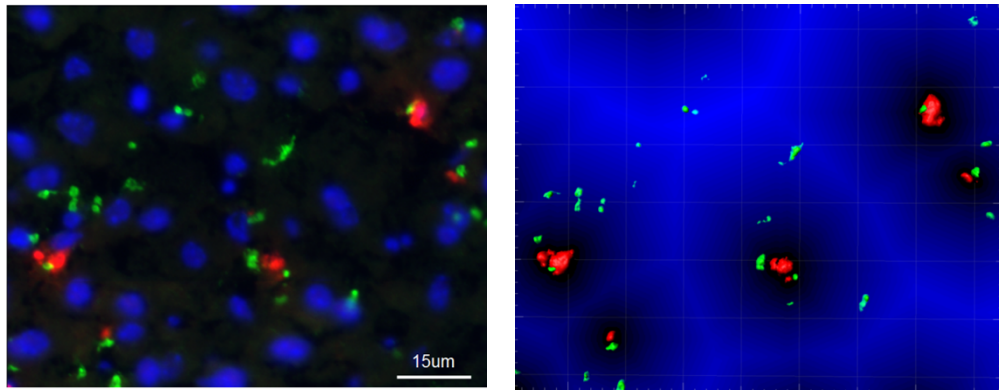


Abbildung 8: Darstellung der Kolokalisation von Thrombozyten- und Bakterienaggregaten

Links: immunhistologischer Schnitt der Leber.

Thrombozyten = grün, Bakterienaggregate = rot, Zellkerne = blau

Rechts: bei diesem Bild handelt es sich um das identische Bild (links) nach Bearbeitung mittels Imaris-Software (Bitplane). Anhand der Software wurden Flächen für Thrombozyten- und Bakterienaggregate erstellt und anschließend die Kolokalisationen dieser bestimmt.

Die gewonnenen Rohdaten aus Imaris wurden weiter mit dem Software-Programm IBM SPSS Version 23 statistisch analysiert.

9. Statistische Messverfahren

Die statistische Auswertung erfolgte anhand der Statistik-Software IBM SPSS Version 23. Die Ergebnisse wurden mit Mittelwerten \pm SD graphisch in Liniendiagrammen oder Balkendiagrammen dargestellt.

Es wurden verschiedene Parameter von Wildtyptieren und Knockouttieren verglichen. Dabei wurde sowohl der Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout zu den einzelnen Zeitpunkten als auch die Änderung bei Wildtyp und Knockout über die Zeit analysiert. Für die Analyse der Daten wurde das lineare gemischte Modell (SPSS) verwendet. Dabei wurde ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant angenommen.

Für die Analyse der Zufälligkeit der Bakterienaggregatgrößen in Wildtyp und Knockout (Abbildung 24, Abbildung 26) wurde der Wald-Wolfowitz-Sequenztest verwendet. Dabei wurde ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant angenommen. Für diese Anwendung wurde ebenfalls das Statistikprogramm SPSS verwendet.

V. ERGEBNISSE

1. Ohrmodell

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Etablierung eines geeigneten Modells zur Darstellung der Thrombozyten-Migration *in vivo*.

In vitro konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Thrombozyten auf Fibrin(ogen)-Oberflächen wandern können. Vor diesem Hintergrund lag der Fokus auf der *in vivo* Darstellung der Wanderung der Thrombozyten im Bereich von Fibrin(ogen).

In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits anhand des Ohrmodells *in vivo* Daten von migrierenden Thrombozyten im Randbereich eines Thrombus gewonnen (99). Um die Migration von Thrombozyten weiter zu verfolgen, wurde dieses Modell aufgrund des einfachen Zugangs zur Mikrozirkulation und der guten Stabilität während der intravitalmikroskopischen Aufnahmen beibehalten. Wie oben beschrieben (IV.6.4.1) wurde mechanisch eine Verletzung am Gefäß gesetzt um so die Bildung eines Thrombus zu induzieren. Zur Darstellung von Fibrin(ogen) in der Mikrozirkulation wurde fluoreszierendes Fibrin(ogen) i.v. injiziert. Es kam an der verletzten Gefäßwand zur Bildung von Thromben (siehe Abbildung 9). Wie in Abbildung 9 gezeigt wird, kommt es unmittelbar nach Induktion der Gefäßverletzung zur Ablagerung von Fibrin(ogen) an der Gefäßwand. In diesem Modell konnten migrierende Leukozyten beobachtet werden, jedoch keine Migration von Thrombozyten. Trotz der stabilen, durch Bewegungsartefakte kaum beeinträchtigten Präparation, ist die Visualisierung einzelner Thrombozyten in diesem Modell über einen längeren Zeitraum (mehr als 120 Minuten) äußerst schwierig. Limitierend dabei ist vor allem die geringe Größe und ihre dichte Anordnung innerhalb des Thrombus. Zudem wurde die Verletzung des freipräparierten Gefäßes manuell gesetzt und konnte nicht standardisiert durchgeführt werden. Dies hatte sowohl Abweichungen des Ausmaßes der Verletzung als auch Unterschiede im Ausmaß des entstehenden Thrombus zur Folge. Es wurden 12 C57BL/6J-Mäuse in diesen Versuch aufgenommen.

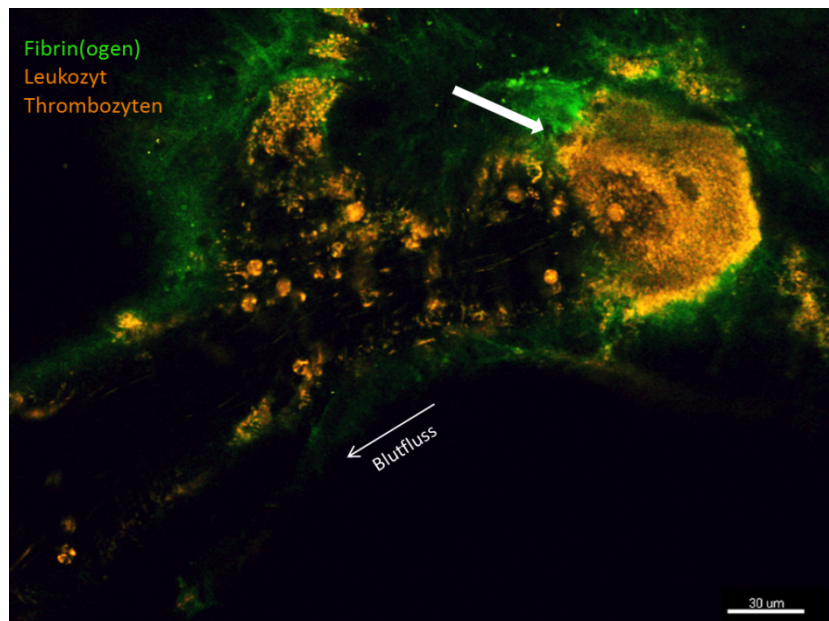


Abbildung 9: Thrombus in der Mikrozirkulation des Ohrs

Standbild aus Videosequenz aus den Aufnahmen in der Mikrozirkulation des Ohrs mittels 2-Photonen-Mikroskopie. Thrombozyten und Leukozyten (Rhodamin-G6) = orange; Alexa Fluor 488 konjugiertes Fibrin(ogen) = grün.

Die mechanische Verletzung des Gefäßes am Ohr führte umgehend zur Bildung eines Thrombus. Rechts im Bild ist der gebildete Thrombus innerhalb des verletzten Gefäßes mit umgebendem Fibrin(ogen) (grün) zu sehen. In dieser Präparation kam es zur Verletzung eines nahe gelegenen kleineren zuführenden Gefäßes, welches mit Thrombozyten okkludiert ist

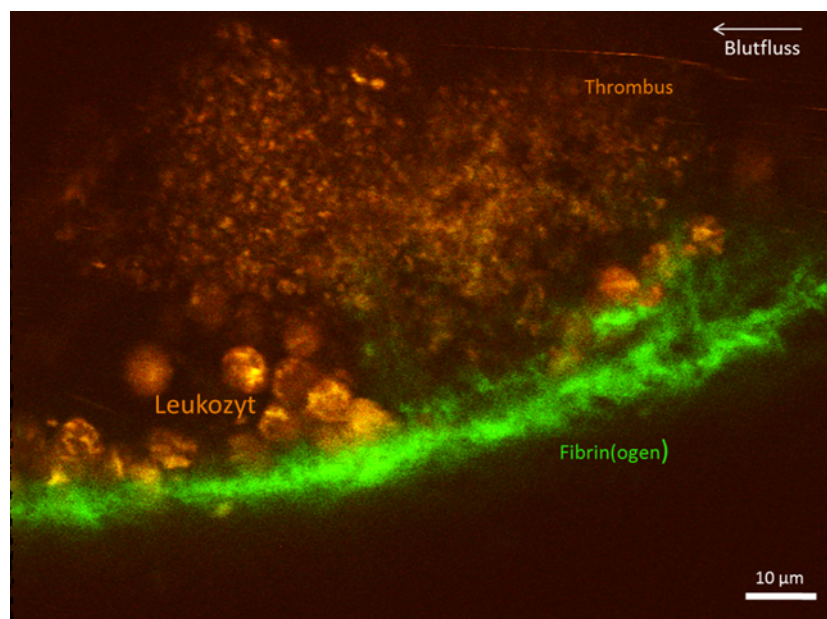


Abbildung 10: Randbereich eines Thrombus in der Mikrozirkulation des Ohrs

Standbild aus Videosequenz aus den Aufnahmen in der Mikrozirkulation des Ohrs mittels 2-Photonen-Mikroskopie. Thrombozyten und Leukozyten (Rhodamin-G6) = orange; Alexa Fluor 488 konjugiertes Fibrin(ogen) = grün.

Im Randbereich des gebildeten Thrombus sind Fibrin(ogen)-Ablagerungen (grün) zu sehen. Die kleinen Thrombozyten sind dicht in dem Thrombus angeordnet. Eine Visualisierung der Migration von Thrombozyten konnte in diesem Modell nicht gezeigt werden, jedoch migrierten die hier abgebildeten größeren Leukozyten im Randbereich des Thrombus.

2. Cremastermodell

Um das Verhalten von Thrombozyten während der Inflammation intravaskulär zu untersuchen wurde das Cremastermodell verwendet. Das von Baez etablierte Cremastermodell (140) wird häufig zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Leukozytenmigration eingesetzt (144-149).

Die Präparation des Cremasters zur Darstellung seiner Mikrozirkulation gestaltet sich aufgrund der exponierten Lage der Hoden und damit einhergehenden guten Zugänglichkeit als relativ einfach. Wie beschrieben (IV.6.4.2), wurde vier Stunden vor Beginn der mikroskopischen Aufnahme eine Entzündung des Gewebes durch intraskrotale Injektion von LPS induziert.

Zur Untersuchung der beiden unten aufgeführten Fragestellungen, wurden insgesamt 12 männliche C57BL/6J-Tiere verwendet.

2.1. Interaktion von Thrombozyten mit Fibrin(ogen)

Zur Visualisierung von Fibrin(ogen)-Ablagerungen innerhalb der Mikrozirkulation wurde über den zuvor präparierten Femoraliskatheter fluoreszierendes Fibrin(ogen) injiziert. Die zirkulierenden Thrombozyten wurden durch Detektion von CD42b mittels Antikörper sichtbar gemacht. Ebenso wurden die CD45-Leukozyten durch Markierung mittels eines i.v. applizierten Antikörpers sichtbar gemacht.

Wie in Abbildung 11 (Pfeile) zu sehen ist, konnten in den intravitalmikroskopischen Aufnahmen Interaktionen von Thrombozyten (DyLight 649) mit Fibrin(ogen) (Alexa Fluor 488) dargestellt werden. Thrombozyten werden in Bereichen von Fibrin(ogen)ablagerungen adhärent. Dieser Kontakt bestand bis zu 8 Minuten. Eindeutige Migrationsvorgänge der Thrombozyten konnten jedoch nicht beobachtet werden. Das Fibrin(ogen) lagerte sich nicht am Gefäßendothel an, sondern akkumulierte vor allem um die Leukozyten (CD45-PE) (Abbildung 11).

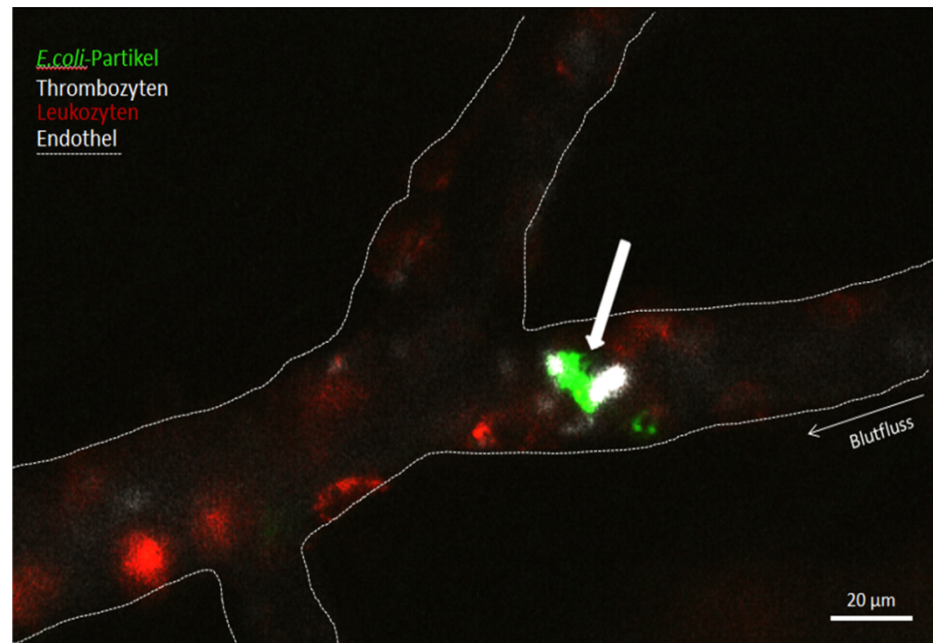


Abbildung 11: Interaktion von Thrombozyten mit Fibrin(ogen) in der Mikrozirkulation des *M. cremaster*

Standbild aus Videosequenz von Aufnahmen in der Mikrozirkulation des *M. cremaster* mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie. Thrombozyten (DyLight 649 labeled Anti-CD42b) = weiß; Leukozyten (CD45-PE) = rot; Alexa Fluor 488 konjugiertes Fibrin(ogen) = grün.

Nach Induktion einer Inflammation mittels intraskrotaler Injektion von LPS, kommt es zur Rekrutierung von Leukozyten (rot), welche das so genannte „Rolling“ entlang der Gefäßwand zeigen und Fibrin(ogen) an ihrer Oberfläche akkumulieren. Thrombozyten traten über mehrere Minuten (bis zu 8 Minuten) mit dem Fibrin(ogen) in Interaktion (Pfeile).

2.2. Interaktion von Thrombozyten mit *E. coli*-Partikeln

In einer weiteren Versuchsreihe wurde eine mögliche Migration von Thrombozyten während der Interaktion mit *E. coli* untersucht. Hierzu wurde eine Inflammation des Cremaster-Gewebes mittels LPS induziert. Nach einer Wartezeit von vier Stunden wurde die Präparation des Muskels wie oben beschrieben (IV.6.4.2) vorgenommen und über den Femoraliskatheter fluoreszierende *E. coli* - Partikel verabreicht. Thrombozyten wurden durch intravenöse Gabe eines Antikörpers (DyLight 649 labeled Anti-CD42b) in der Mikrozirkulation sichtbar gemacht.

Wie in Abbildung 12 zu sehen, konnte auch hier eine eindeutige Interaktion der Thrombozyten (von bis zu vier Minuten) mit den akkumulierten Partikeln dargestellt werden. Gleichermäßen wie bei Fibrin(ogen) kam es nicht zu Anlagerungen der Partikel im Bereich des Gefäßendothels.

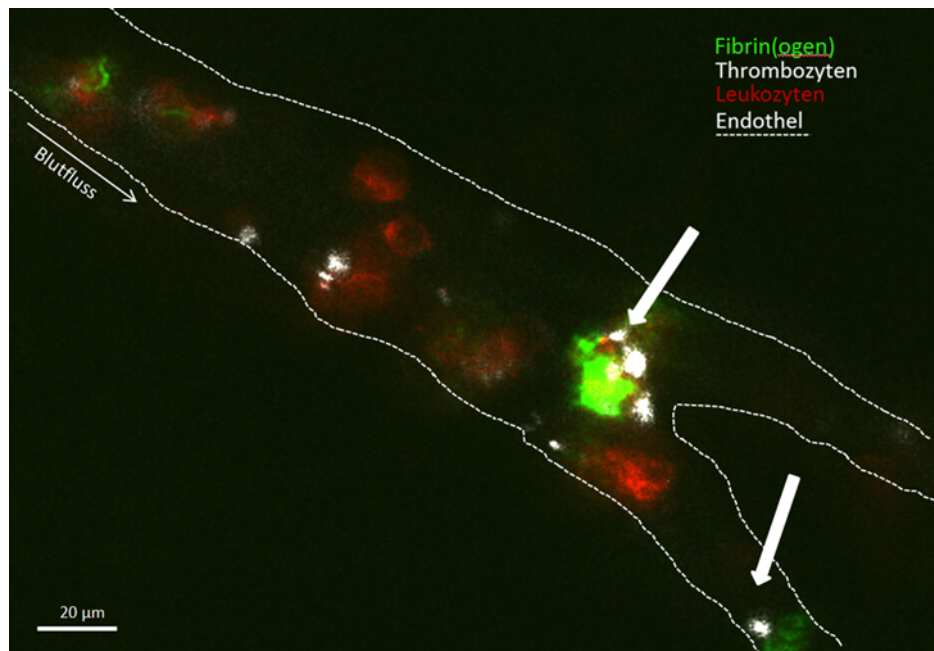


Abbildung 12: Interaktion von Thrombozyten mit *E. coli*-Partikel in der Mikrozirkulation des *M. cremaster*

Standbild aus Videosequenz von Aufnahmen in der Mikrozirkulation des *M. cremaster* mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie. Thrombozyten (CD41 DyLight 695) = weiß; Leukozyten (CD45-PE) = rot; Alexa Fluor 488 konjugierte *E. coli*-Partikel = grün.

Nach Induktion einer Inflammation mittels intraskrotaler Injektion von LPS des *M. cremaster* wurden *E. coli*-Partikel über den Femoraliskatheter appliziert. Es konnten Interaktionen (Pfeil) von bis zu vier Minuten von Thrombozyten mit den *E. coli*-Partikel beobachtet werden.

3. Leber-Modell

Der Magen-Darm-Trakt gilt als potentielle Eintrittspforte vieler Pathogene, welche über das Blut der Portalvene im gesamten Organismus verteilt werden können. Das macht die Leber, welche Blut über die Portalvene erhält, zu einem wichtigen Organ im Abwehrkampf verschiedener Krankheitserreger. Somit erlangt die Leber, im speziellen durch die hoch spezialisierten Kupffer-Zellen, welche die Sinusoide auskleiden und an der Filterung der Bakterien beteiligt sind, steigende Aufmerksamkeit hinsichtlich ihrer wichtigen Funktion als immunologisches Organ (112). So wurden bereits *in vivo* intravitalmikroskopische Untersuchungen an der Leber in einem Infektionsmodell mit Bakterien vorgenommen (10). Hierbei konnten neben der Beteiligung von Kupffer-Zellen Thrombozyten als Interaktionspartner in der Bekämpfung von Pathogenen aufgezeigt werden (10).

Um die Interaktion von Thrombozyten im Rahmen einer *E. coli*-Sepsis live innerhalb eines zentralen Organs zu verfolgen, wurde die Leber präpariert und mittels 2-Photonen-Mikroskopie intravitalmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

Zur Darstellung der Thrombozyten wurde die Rosa26mT/mGxPf4Cre-Mauslinie (n = 3), bei der alle Cre-exprimierenden Zellen rot fluoreszieren und deren Thrombozyten grün fluoreszieren, verwendet. Alternativ wurden aus einem Spendertier Thrombozyten isoliert und mit CFDA-SE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) angefärbt. Diese wurden anschließend dem Empfängertier (n = 6), an dem die intravitalmikroskopischen Aufnahmen durchgeführt wurden, über die Schwanzvene injiziert. Die Bakterien wurden mit dem Farbstoff eFluor angefärbt und ebenfalls i.v. appliziert. Außerdem wurde zur Visualisierung der Fibrin(ogen) Depositionen fluoreszierendes Fibrin(ogen) (Alexa Fluor 488) injiziert.

Die vorzunehmende Präparation in diesem Modell ist als sehr invasiv anzusehen. Zunächst musste eine Tracheotomie zur Intubation des Tieres vorgenommen werden. Die Intubation ist unabdingbar um Atmungsartefakte während der mikroskopischen Aufnahmen möglichst gering zu halten und so eine möglichst hohe Stabilität während der Aufnahmen zu erreichen.

Die Präparation der Leber erfordert große Sorgfalt und präzises Arbeiten ist Voraussetzung. Beim Vorverlagern des Leberlappens musste genau darauf geachtet werden, dass es zu keiner Einschränkung des Blutflusses kommt. Außerdem musste der Kontakt des Deckglases an der Oberfläche des Parenchyms so gering wie möglich gehalten werden, um Kompressionen und Störungen des Blutflusses zu vermeiden. War der Kontakt zu eng, kam es sehr schnell zu Aggregatbildung von Thrombozyten in den Gefäßen. Des Weiteren war es sehr wichtig das Leberparenchym ständig feucht zu halten um es vor Austrocknung in der beheizten Kammer des Mikroskops zu bewahren. Erste Erfolge hinsichtlich der zunächst sehr instabilen Bildaufnahmen gelangen durch die Synchronisation der Bildaufnahmen mit dem EKG-Signal und dem Atemzyklus über eine Triggersoftware (AD Instruments, LAB Charts, New

Zeeland). So konnte die Atmung des Tieres getriggert werden. Alle 20 Sekunden wurde dabei die Atmung für 3 Sekunden angehalten und ein Bild aufgenommen.

Mit den ausgewählten Fluoreszenzen gelang eine gute Darstellung von Thrombozyten (CFDA-SE), Bakterien (e-Fluor 670) und Fibrin(ogen) (AF 594) innerhalb der Sinusoide der Leber. Wie in Abbildung 14 zu sehen, konnten auch in der Leber Thrombozyten und Bakterien im Bereich von Fibrin(ogen) in Einzelbildern aufgenommen werden. Trotz des technischen Aufwands ist die Bildstabilität zu gering, um Langzeitaufnahmen der Mikrozirkulation in der Leber anzufertigen, bei denen Thrombozyten verlässlich über einen Zeitraum von mehr als 30 Minuten nachverfolgt werden können.

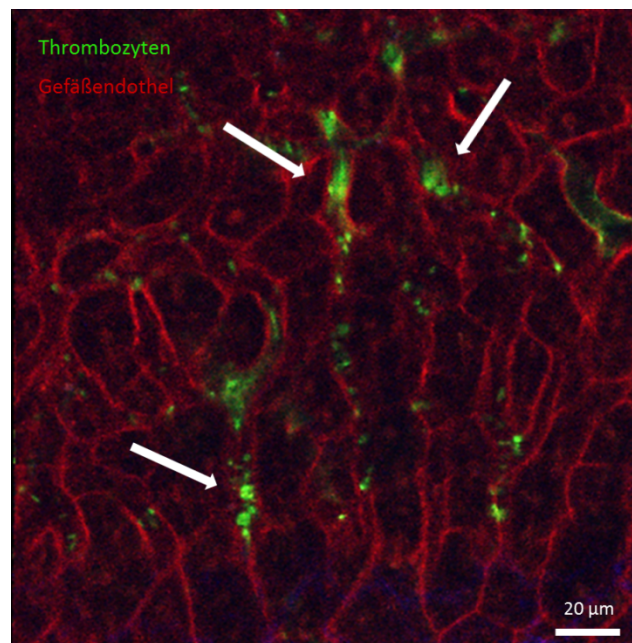


Abbildung 13: Mikrozirkulation der Leber

Standbild aus Videosequenz von Aufnahmen in der Mikrozirkulation der Leber mittels 2-Photonen-Mikroskopie. Bei der hier verwendeten Mauslinie (Rosa26mT/mGxPF4Cre) fluoreszieren Thrombozyten grün und Endothelzellen rot.

In den Sinusoiden kommt es aufgrund des Präparationsschadens zur Bildung von Thrombozytenaggregaten (Pfeile).

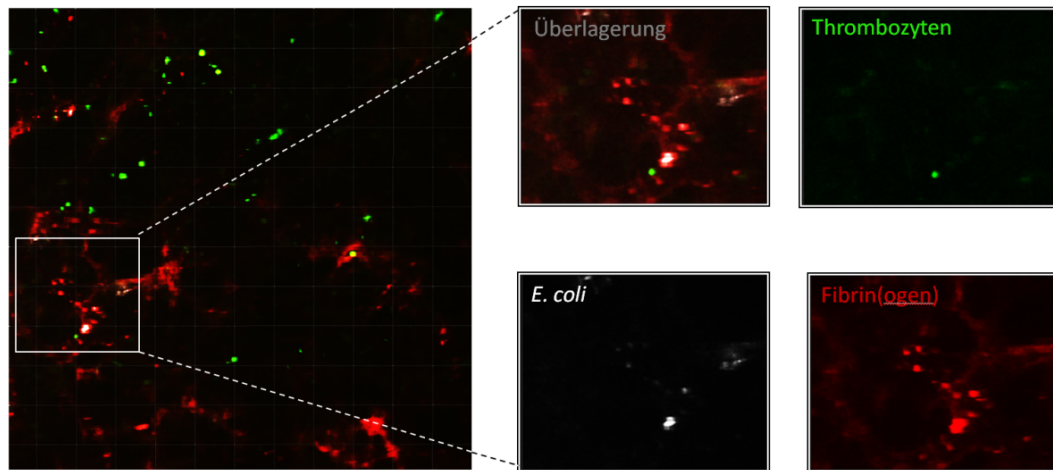


Abbildung 14: Darstellung der kombinierten Fluoreszenzen im Lebermodell

Standbild aus Videosequenz von Aufnahmen in der Mikrozirkulation der Leber mittels 2-Photonen-Mikroskopie. Thrombozyten (DCF) = grün; *E. coli* (eFluor 670) = weiß; Alexa Fluor 594 konjugiertes Fibrin(ogen) = rot.

Zur Darstellung von Thrombozyten und Bakterien in Umgebung von Fibrin(ogen) innerhalb der Mikrovasculatur der Leber mittels 2-Photonen-Mikroskops erwies sich das oben dargestellte Setting als sehr gut.

4. Sepsis-Modell

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde bereits die Leber im Rahmen einer *E. coli*-Sepsis untersucht (110). Dabei konnte gezeigt werden, dass es zu Fibrin-Ablagerungen in den Sinusoiden kommt (110). Eine Beteiligung der Thrombozyten wurde aber in diesem Zusammenhang nicht gezeigt. Aus anderen Arbeiten ist jedoch eine Beteiligung von Thrombozyten an der Bekämpfung bakterieller Infektionen in der Leber bekannt (9, 10). Um die Relevanz der Thrombozytenmigration im Rahmen einer Sepsis zu untersuchen wurden zwei Mauslinien (CD41YFP^{ki/ki}-Linie (n = 4), MYH9^{-/-}-Linie (n = 6)) mit migrationsdefizienten Thrombozyten herangezogen und zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

Da *in vitro* Vorexperimente gezeigt haben, dass die Thrombozytenmigration α IIb β 3-Integrin-abhängig ist, wurden in der ersten Versuchsreihe die CD41YFP^{ki/ki}-Linie, bei der es sich im homozygoten Falle um funktionelle α IIb β 3-Knockouts handelt, verwendet, welche mit Wildtyptieren verglichen wurden.

Zur Induktion der Sepsis wurden den Tieren $3,2 \times 10^8$ *E. coli* intravenös über die Schwanzvene appliziert. Bis zum Endzeitpunkt des Versuches

standen die Tiere unter engmaschiger Beobachtung. Um eine Verteilung der Bakterien und des Fibrin(ogen) im Verlauf der Sepsis zu untersuchen, wurde eine Zeitreihe erstellt. Dazu wurden nach einer, vier, zwölf und vierundzwanzig Stunden Organe (Leber, Milz) sowie Blut entnommen. Von den Organen und Blut wurden in Vorversuchen CFUs bestimmt. In den anschließenden Versuchen wurden histologische Schnitte von den Organen angefertigt, wobei der Fokus auf der Leber lag.

4.1. CFUs

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde untersucht, in welchem Organ die meisten Bakterien nach Infektion nachzuweisen sind. Dazu wurden verschiedene Verdünnungsstufen der homogenisierten Organe und des intrakardial entnommenen Blutes der septischen Tiere auf Agar-Platten ausgestrichen und die CFUs nach sechs Stunden ausgezählt. Dabei konnte die größte Anzahl an CFUs in der Leber ($8,5 \times 10^5/\text{g}$) bestimmt werden. Weniger konnten in der Milz ($5,2 \times 10^5/\text{g}$) bestimmt werden und am wenigsten CFUs konnten im Blut (1.340/ml) nachgewiesen werden.

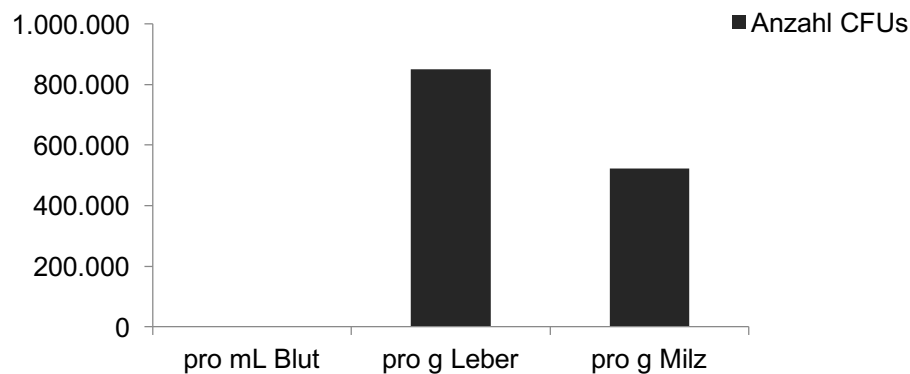


Abbildung 15: Anzahl der Colony Forming Units (CFUs)

Die größte Bakterienlast wurde mit einer Anzahl von rund $8,5 \times 10^5$ CFUs/g in der Leber gezählt. Am wenigsten Bakterien konnten im Blut (1.340 CFUs/ml) post infectionem nachgewiesen werden. $n = 4$

4.2. Fibrin(ogen)-Deposition

Wie bereits in einer früheren Arbeit von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, kommt es im Rahmen einer durch *E. coli* induzierten Sepsis zu Fibrin-Ablagerungen innerhalb der Lebersinusoiden (110). Diese Untersuchung wurde sechs Stunden nach intravenöser Verabreichung der Bakterien

mittels histologischer Schnitte der infizierten Leber durchgeführt (110). Zur Analyse des Verlaufs von Fibrin(ogen)-Depositionen zu früheren (1 h, 4 h) beziehungsweise späteren (12 h, 24 h) Zeitpunkten, wurden das Fibrin(ogen) (IV.8.2) angefärbt. Anhand der histologischen Schnitte konnte eine Deposition dessen in den Sinusoiden nachgewiesen werden. Bereits nach einer Stunde der Infektion kommt es zu Fibrin(ogen)-Ablagerungen in den Gefäßen. Nach vier Stunden ist die Ablagerung deutlich dichter. Auch nach 12 Stunden sowie nach 24 Stunden sind Fibrin(ogen)-Depositionen in der Mikrozirkulation sichtbar.

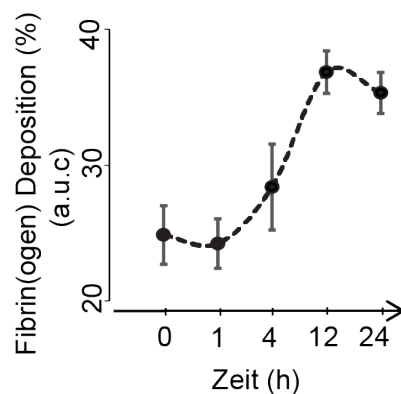


Abbildung 16: Fibrin(ogen) Verteilung im Zeitverlauf

Quantitative Analyse der Fibrin(ogen)-Deposition (%) in den immunhistologischen Schnitten der Leber.

Bereits nach einer Stunde kommt es im Rahmen einer *E. coli*-Sepsis zur Ablagerung von Fibrin(ogen) innerhalb der Lebersinusoide. Diese nimmt über den Verlauf stetig zu und erreicht ihren Höhepunkt nach 12 Stunden.

Mittelwert \pm SD; n = 4

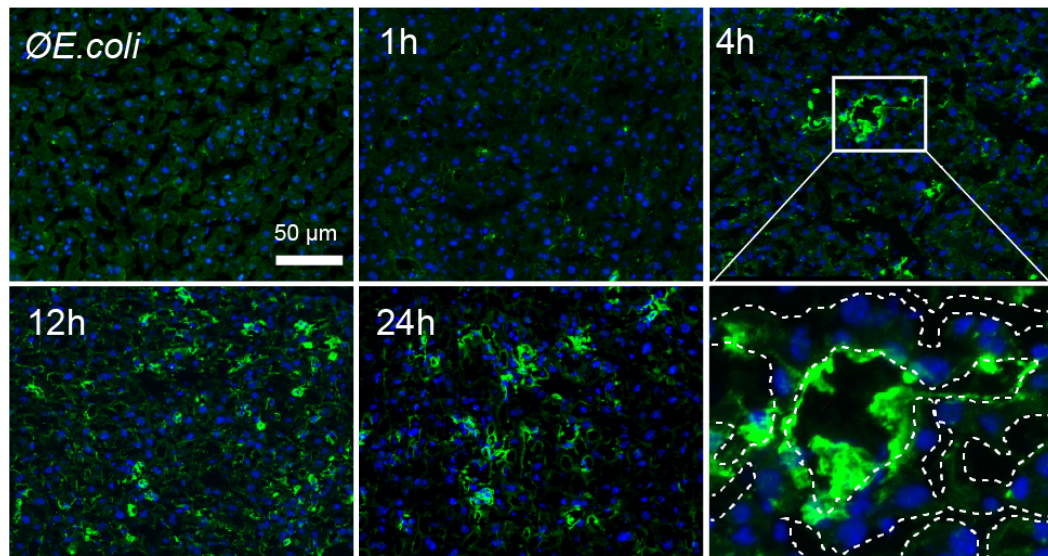


Abbildung 17: Fibrin(ogen)-Deposition in den Sinusoiden

Darstellung der Fibrin(ogen)-Depositionen in den Lebersinusoiden anhand immunhistologischer Schnitte. Fibrin(ogen) (AF 488 konjugierter Anti-Fibrin(ogen) Antikörper) = grün; DAPI = blau; gestrichelte Linie kennzeichnet die Sinusoide.

Unter physiologischen Bedingungen ist keine Deposition von Fibrin(ogen) nachzuweisen. Nach Induktion einer systemischen (i.v.) *E. coli*-Sepsis kommt es bereits nach einer Stunde zu ersten Ablagerungen von Fibrin(ogen) innerhalb der Lebersinusoide. Diese sind zum 4 h-Zeitpunkt deutlich stärker ausgeprägt, wie in dem vergrößerten Bildausschnitt zu sehen.

4.3. Thrombozytenanzahl

Auch die Anzahl der in den Sinusoiden lokalisierten Thrombozyten wurde mittels Histologie ermittelt. In dieser Versuchsreihe wurden $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin-defiziente-Tiere ($\text{CD41-YFP}^{ki/ki}$) verwendet und mit Wildtyp-Tieren verglichen.

Außerdem wurde das entnommene Blut der Tiere untersucht. Als Kontrolle dienten uns KO- und WT-Tiere von nicht-infizierten Mäusen, denen ein identisches Volumen an physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) verabreicht wurde. Die Anzahl an im Blut zirkulierenden Thrombozyten betrug in den Kontrollmäusen im Durchschnitt $550 \times 10^3 / \mu\text{l}$. In den infizierten Mäusen ist über die Zeit ein Abfall an gemessenen Thrombozytencounts sowohl im Wildtyp als auch im Knockout zu beobachten. Innerhalb der ersten vier Stunden fällt der Wert am stärksten ab. Die Anzahl der Thrombozyten im Wildtyp ist zu diesem Zeitpunkt niedriger als im Knockout.

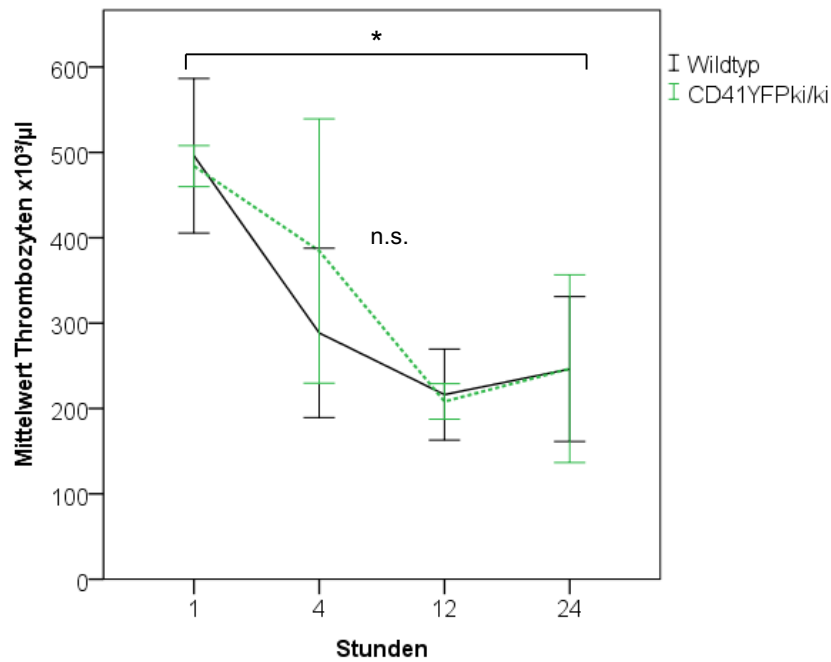


Abbildung 18: Thrombozyten-Messung im Vollblut

Die Zahlder im Blut gemessenen Thrombozyten nimmt im Rahmen der *E. coli*-Sepsis im Laufe der Zeit ab. (Die Zahlen weichen dabei nur zu dem 4-Stunden Zeitpunkt in Knockout (CD41YFP^{ki/ki}) und Wildtyp voneinander ab.

Lineare gemischte Modell; Zeiteinfluss: Signifikanz: * = $p < 0,05$; Unterschied WT/KO: Signifikanz: n.s. = $p > 0,05$; Fehlerbalken: \pm SD, $n = 4$

Die Zahl der Thrombozyten und Thrombozytenaggregate wurde in histologischen Schnitten der Leber mit Hilfe der Imaris-Software analysiert und so die Anzahl der Thrombozytenflächen zu den verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 4 h, 12 h, 24 h) quantifiziert. Allgemein nahmen die Thrombozytenzahlen über den Zeitverlauf ab. Die Anzahl der gezählten Thrombozyten im Wildtyp war zu Beginn (1 h) höher als in den CD41YFP^{ki/ki}. Ein Maximum mit 5 000 counts/FOV zeigte sich zum 4h-Zeitpunkt. Zu diesem Zeitpunkt lagen nahezu gleiche Zahlen an Thrombozyten in Wildtyp und Knockout vor. Die Anzahl reduzierte sich über die nächsten Stunden wieder auf zirka die Hälfte. Nach 24h war die Anzahl der Thrombozyten beziehungsweise deren Fläche nochmals deutlich reduziert. Die Anzahl der Thrombozytenregionen bzw. gemessenen Thrombozytenflächen stehen somit unter einem deutlichen Zeiteinfluss, jedoch konnte zwischen WT und KO kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

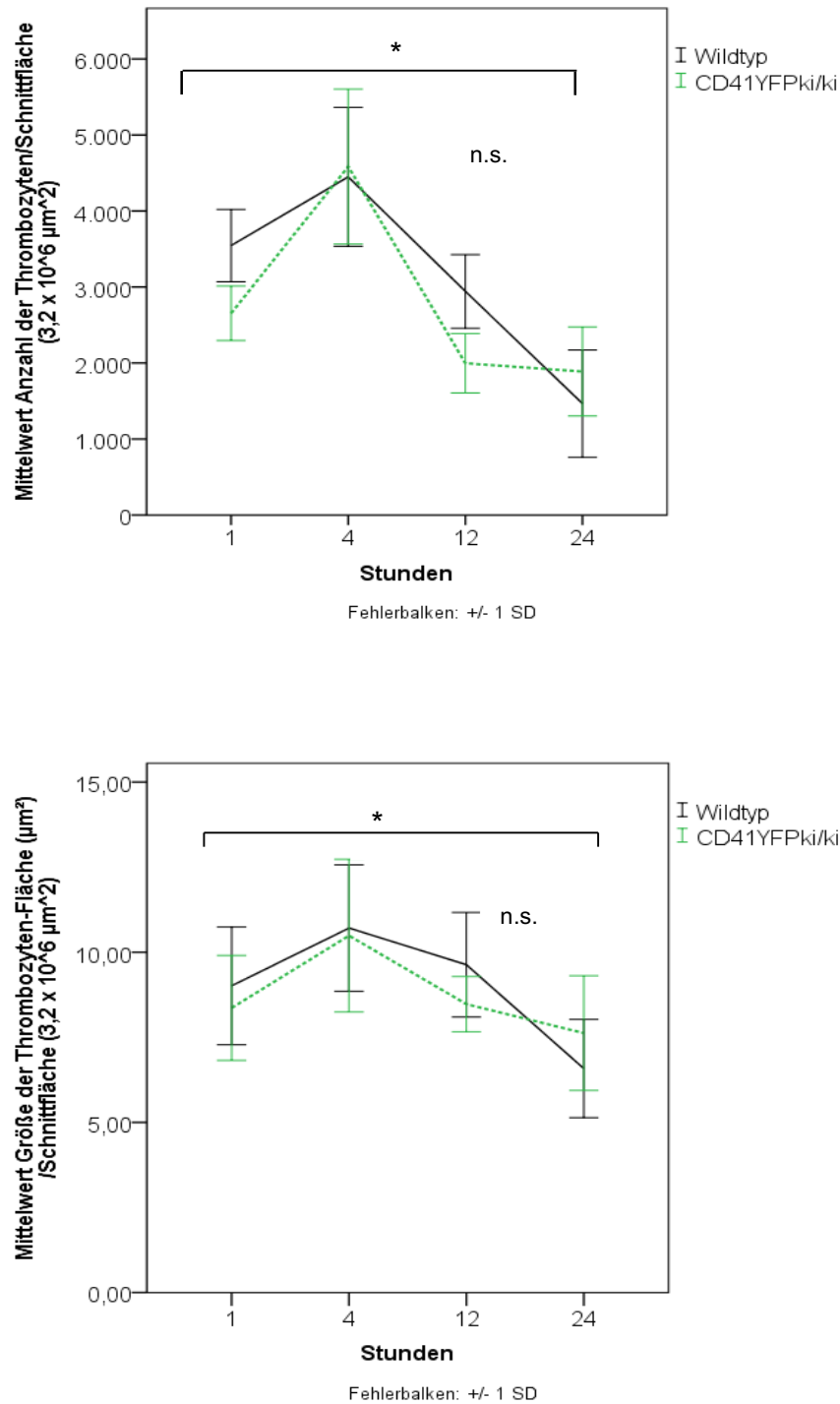


Abbildung 19: Quantitative Analyse der Anzahl und Fläche der Thrombozyten in immunhistologischen Schnitten der Leber

Zu dem 1-Stunden Zeitpunkt ist die Anzahl der Thrombozytenfläche (oben) bzw. Anzahl der Thrombozytenregionen (unten) im Wildtyp höher als im Knockout. Ein Maximum der beiden Parameter wird nach vier Stunden in beiden Gruppen erreicht, wobei die Werte in Knockout und Wildtyp nahezu identisch sind. Zu den weiteren Zeitpunkten ist ein deutlicher Rückgang zu vermerken.

Lineare gemischte Modell; Zeiteinfluss: Signifikanz: * = $p < 0,05$; Unterschied WT/KO: Signifikanz: n.s. = $p > 0,05$; Fehlerbalken: \pm 1 SD; n = 4

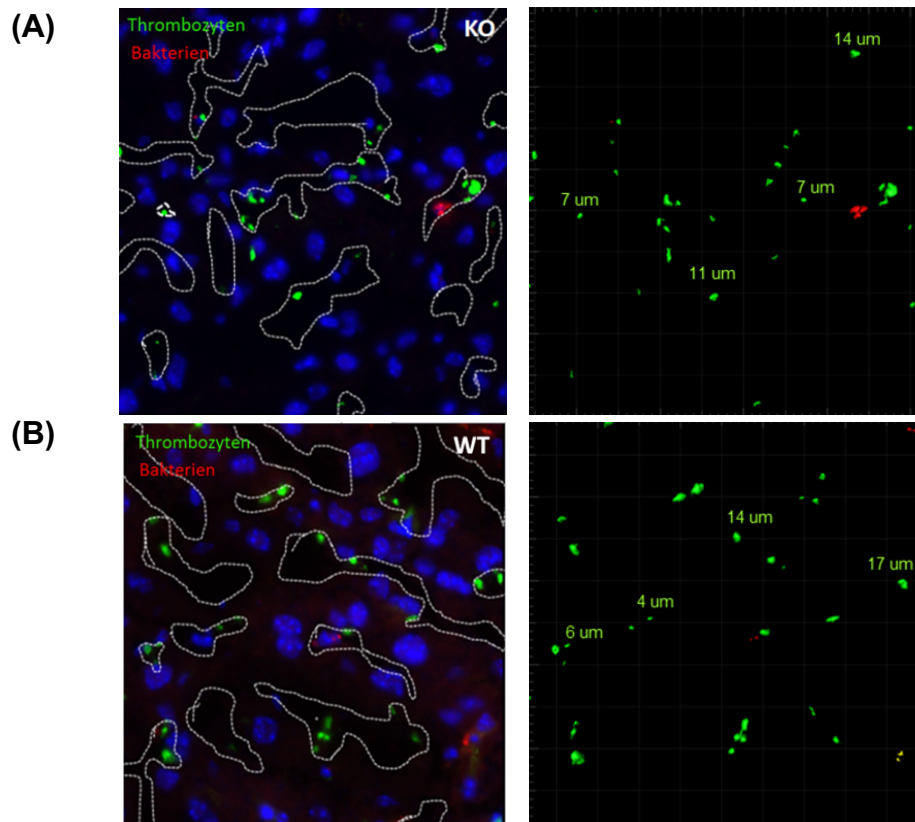


Abbildung 20: Thrombozyten-Regionen zum 4 h-Zeitpunkt

Darstellung der Thrombozyten Regionen in KO (A) und WT (B) in repräsentativen immunhistologischen Schnitten (Links), sowie nach Bearbeitung anhand der Imaris-Software (Bitplane). Thrombozyten (CD42b) = grün; *E. coli* (Anti-*E. coli* O&K-Antigen) = rot; DAPI = blau; gestrichelte Linie kennzeichnet die Sinusoide. Die Thrombozyten-Regionen in Knockout und Wildtyp weisen dabei ähnliche Größen auf.

4.4. Bakterienanzahl

Ebenso wurde die Anzahl der Bakterien in den histologischen Schnitten untersucht. Sowohl die Anzahl der Thrombozyten nahm über die Zeit ab, als auch die Anzahl der Bakterienaggregate. Die höchste Bakterienanzahl wurde zum 1 h-Zeitpunkt gezählt. Nach 24 h waren nur noch vereinzelt, teilweise schlecht erkennbare Bakterien bzw. Bakterienfragmente in den histologischen Schnitten zu identifizieren. Die Anzahl der Bakterien war zum 4 h-Zeitpunkt in Knockout und Wildtyp nahezu identisch.

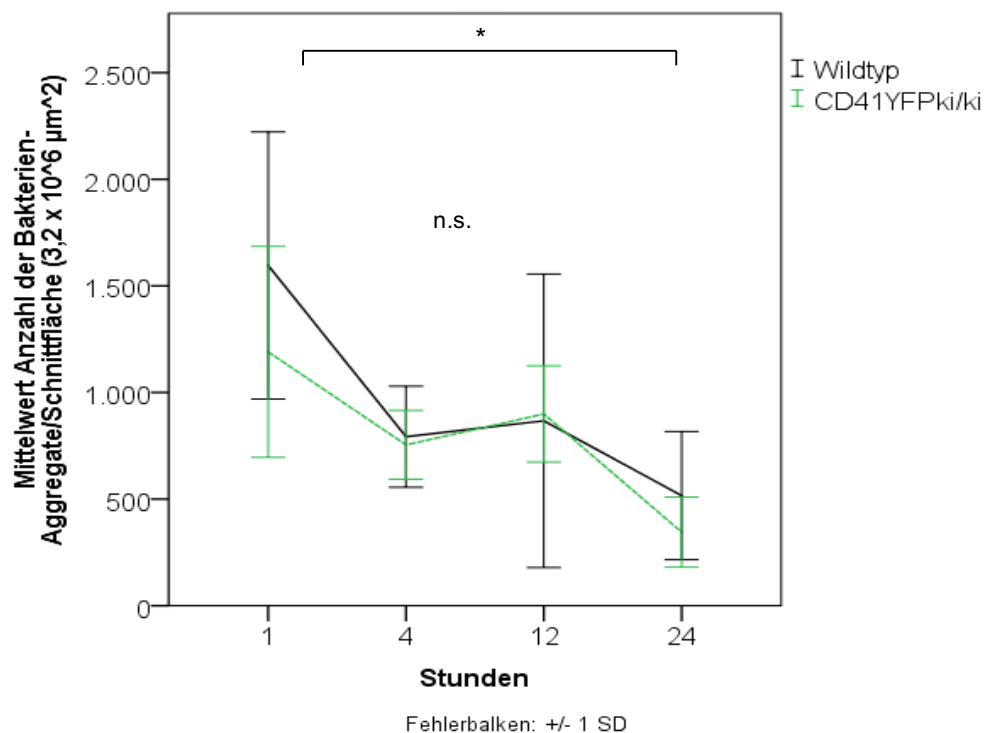


Abbildung 21: Bakterienaggregate

Quantitative Analyse der Anzahl der Bakterienaggregate in den immunhistologischen Schnitten der Leber.

Nur zu Beginn weist der Wildtyp mehr Bakterienaggregate als der Knockout auf. Nach vier Stunden ist die Anzahl der Bakterienaggregate deutlich verringert und nahezu identisch in Knockout und Wildtyp. Nach 12 Stunden ist die Anzahl noch immer gleich in beiden Gruppen und reduziert sich erst zum 24-Stunden-Zeitpunkt deutlich.

Lineare gemischte Modell; Zeiteinfluss: Signifikanz: * = $p < 0,05$, Unterschied WT/KO: Signifikanz: n.s. = $p > 0,05$; Fehlerbalken: +/- SD; n = 4

Jedoch war ein Unterschied der eingenommenen Flächen der Bakterien in Knockout und Wildtyp zu vermerken. Die ermittelte Bakteriengesamtfläche war im Wildtyp zu jedem Zeitpunkt höher als im Knockout, wobei beim 4 Stunden-Zeitpunkt die Differenz am höchsten war.

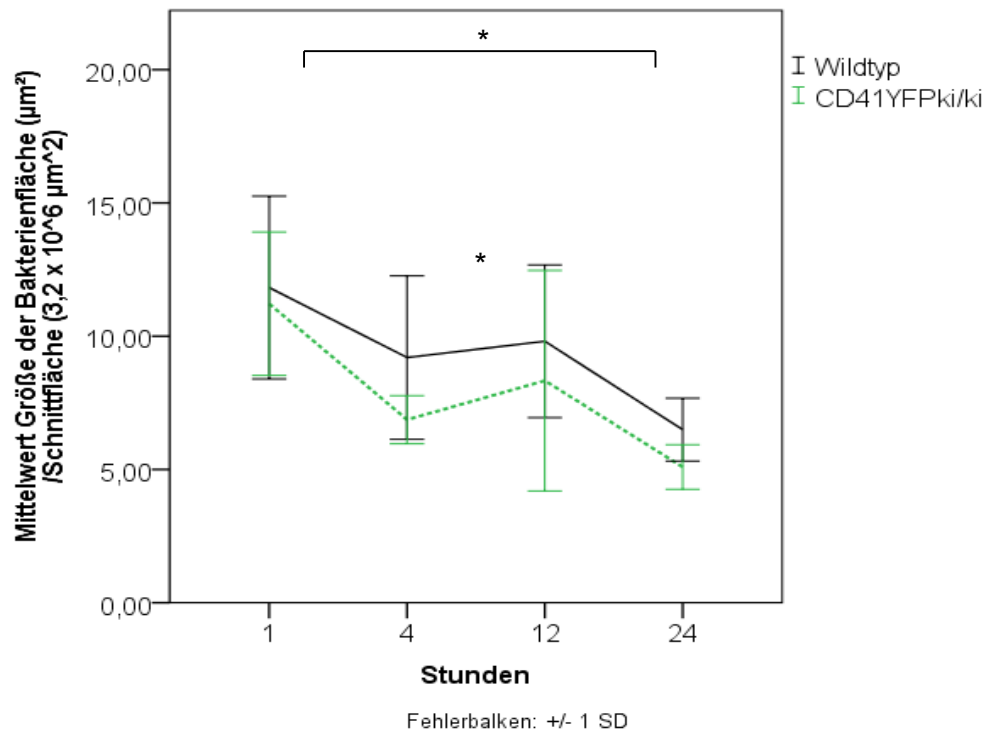


Abbildung 22: Mittelwert der Fläche der Bakterienaggregate

Quantitative Analyse der Bakterienfläche in den immunhistologischen Schnitten der Leber.

Der Mittelwert der Bakterien-Gesamtfläche ist zu jedem Zeitpunkt im Wildtyp höher als im Knockout, wobei die größte Differenz zum 4 h-Zeitpunkt zu vermerken ist.

Lineare gemischte Modell, Zeiteinfluss: Signifikanz: * = $p < 0,05$; Unterschied WT/KO: Signifikanz * = $p < 0,05$, Fehlerbalken: ± 1 SD, $n = 4$

4.5. Kolokalisationen von Thrombozyten mit Bakterien

Um Bakterienaggregate, die mit Thrombozyten interagieren in den histologischen Schnitten zu untersuchen, wurden anhand der Imaris-Software mit der „Distance Transformation“-Funktion diejenigen Thrombozyten bestimmt, die mit einer Entfernung von 0 μm unmittelbar an Bakterien angrenzten und somit kolokalisierten.

Auch hier war ein signifikanter Zeiteinfluss zu vermerken. Die Gesamtzahl der Kolokalisationen von Thrombozyten und *E. coli* in Wildtyp und Knockout variierte jedoch nicht stark (Abbildung 23 (A)). Jedoch wurden insgesamt größere Bakterienaggregate von Wildtyp-Thrombozyten gebunden (Abbildung 23 (B) $p = 0,062$). Der größte Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout war dabei zu dem 4 h-Zeitpunkt zu vermerken. Zu dem 4 h-Zeitpunkt wurden von den $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -defizienten-Thrombozyten

deutlich mehr kleinere Aggregate an Bakterien gebunden als vom Wildtyp (Abbildung 24). Jedoch befanden sich deutlich weniger große Bakterien-Aggregate, mit einer Größe von mehr als $20 \mu\text{m}^2$, in dem Knockout in Kolokalisation mit Thrombozyten im Vergleich zum Wildtyp. Die Abfolge der auftretenden Größen der Bakterienaggregate in Wildtyp und Knockout ist dabei signifikant ($p = 0,024$) nicht zufällig (Wald-Wolfowitz-Sequenztest).

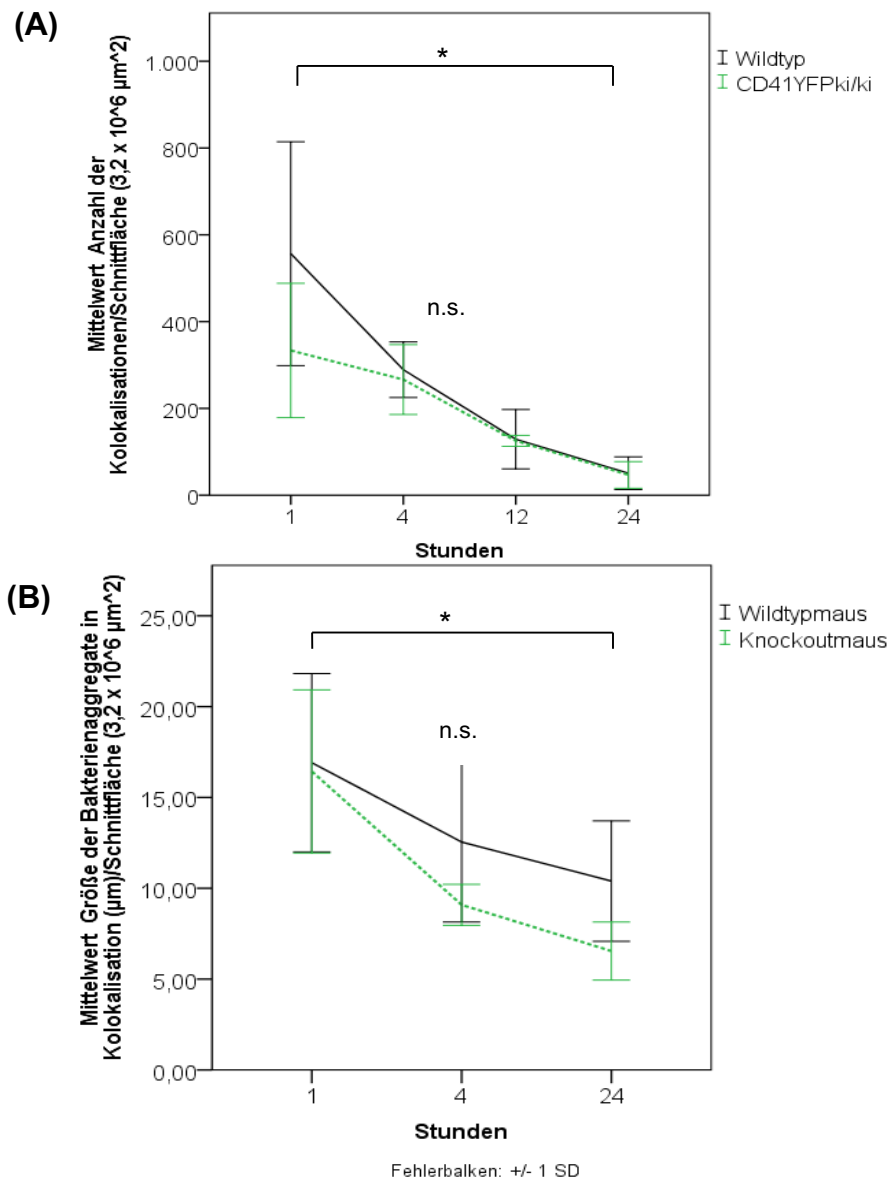


Abbildung 23: Kolokalisationen von Thrombozyten mit Bakterien

Quantitative Analyse der Kolokalisationen von Thrombozyten und Bakterien in den immunhistologischen Schnitten der Leber (oben) sowie die Größe der sich in Kolokalisation befindlichen Bakterienaggregate in KO und WT (unten).

Anzahl der Kolokalisationen in KO und WT

Insgesamt nimmt die ermittelte Anzahl an Kolokalisationen über die Zeitpunkte kontinuierlich gleichermaßen in KO und WT ab. Zu dem 1h-Stunden-Zeitpunkt sind jedoch deutlich mehr Kolokalisationen im WT vorhanden. Im weiteren Zeitverlauf ist jedoch kein Unterschied mehr zu vermerken.

Lineare gemischte Modell, Zeiteinfluss: Signifikanz: n.s.= $p > 0,05$; Unterschied WT/KO: n.s.= $p > 0,05$; Fehlerbalken: \pm SD; n=4

Größe der Bakterien in Kolokalisation

Die mittlere Größe der sich in Kolokalisation befindlichen Bakterienaggregate ist zu jedem Zeitpunkt im WT größer ($p=0,062$), wobei der größte Unterschied zum 4h-Zeitpunkt besteht.

Lineare gemischte Modell, Zeiteinfluss: Signifikanz: * = $p < 0,05$; Unterschied WT/KO: n.s.= $p > 0,05$; Fehlerbalken: \pm SD; n=4

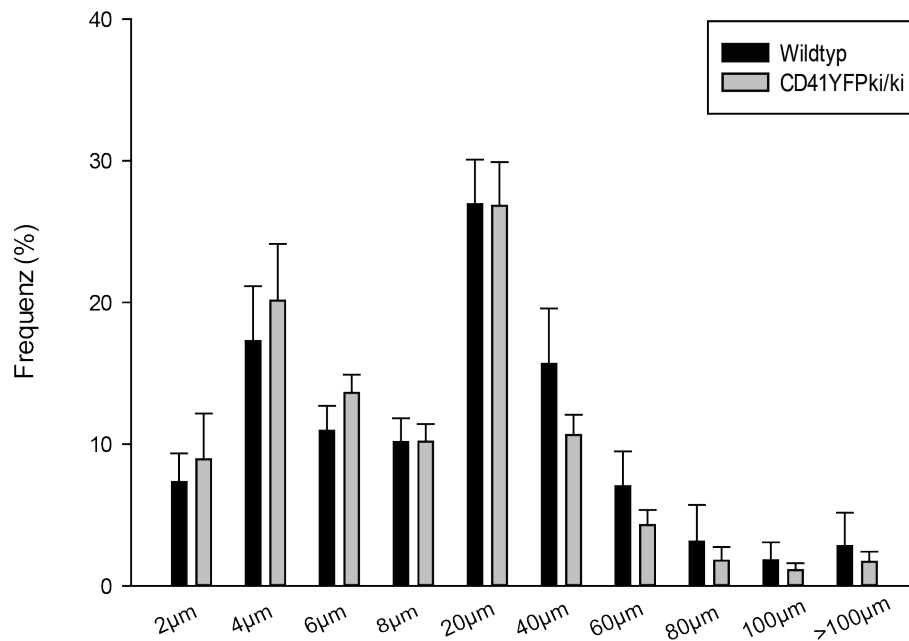


Abbildung 24: Frequenz (%) der Größen der Bakterienaggregate in Kolokalisation

Unterteilung der sich in Kolokalisation befindlichen Bakterienaggregate von WT und KO aus Abbildung 23 (B) nach Aggregat-Größe (ausgewertete Schnittfläche pro Präparat: $\sim 3,2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$)

(A) Kleine Aggregate (2-8 µm)

In den KO-Tieren überragen mehrheitlich kleine Aggregate

(B) Große Aggregate (20-100 µm)

Deutlich mehr große Bakterienaggregate sind im WT zu vermerken, signifikant mehr mit einer Größe von 40 µm sowie 60 µm (* = $p < 0,05$).

Die Abfolge der auftretenden Größen der Bakterienaggregate ist mit einem p-Wert von 0,024 signifikant nicht zufällig (Wald-Wolfowitz-Sequenztest). Fehlerbalken: ± 1 SD; $n = 4$

Auch die Aggregate an Bakterien, die mehr als 0 µm von den Thrombozyten entfernt waren und sich somit nicht mit Thrombozyten in Kolokalisation befanden waren im Wildtyp größer als im Knockout.

4.6. 4h-Zeitpunkt

Um eine physiologische Relevanz der Migration von Thrombozyten *in vivo* zeigen zu können, wurde wie oben beschrieben mit einer Zeitreihe mit der CD41YFP^{ki/ki}-Linie (funktioneller $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin-Knockout) begonnen ($n = 4$). Hier zeigte sich, dass zu jedem der untersuchten Zeitpunkte, der Wildtyp-Stamm eine signifikant größere Fläche an Bakterien aufweist. Als besonders interessant erwies sich der 4h-Zeitpunkt. Die Anzahl der Regionen bzw. gemessenen Fläche der Thrombozyten unterschied sich in WT und KO zu diesem Zeitpunkt kaum. Jedoch war ein entscheidender

Unterschied in der Größe der Bakterienaggregate, welche sich in Kolokalisation mit Thrombozyten befanden, zu vermerken. Wie oben (Abbildung 24) gezeigt, befanden sich signifikant mehr größere Bakterienaggregate im Wildtyp in Kolokalisation mit Thrombozyten. Um diesen Untersuchungen nachzugehen und zu prüfen, ob es sich dabei um einen Thrombozyten-migrationsabhängigen Effekt handelt, wurde eine zweite Mauslinie (Pf4CrexMYH9^{ki/ki}), von der ein Migrationsdefekt der Thrombozyten aus *in vitro* gewonnenen Daten bekannt ist(99), zusätzlich für den 4h-Zeitpunkt herangezogen (n =6). Diese Linie zeigt aufgrund einer reduzierten Expression der Myosin Heavy Chain 9 in den Megakaryozyten einen stark reduzierten Anteil an Myosin im Zytoskelett der Thrombozyten. Somit sind Thrombozyten dieser Mauslinie nicht in der Lage zu migrieren.

Mit der Wahl dieser beiden Mauslinien, denen migrationsdefiziente Thrombozyten gemeinsam sind, sollte die Relevanz der Thrombozyten-Migration innerhalb der *E. coli*-Sepsis aufgezeigt werden.

4.6.1. Anzahl der Thrombozyten und Bakterien zum 4h-Zeitpunkt in CD41YFP^{ki/ki}-und MYH9-defizienten-Tieren

Die in den histologischen Schnitten untersuchte Anzahl der Thrombozyten zum 4 h-Zeitpunkt war in den in den CD41YFP^{ki/ki}-Tieren ähnlich wie im Wildtyp. Auch bei den MYH9^{-/-} und deren Wildtyp variierte die Anzahl der Thrombozyten in der Leber nicht stark (siehe Abbildung 25).

Auch die Ergebnisse der Anzahl der Bakterien gestaltete sich zum 4h-Zeitpunkt ähnlich. Nahezu gleiche Anzahlen von Bakterien lagen in Knockout-Stämmen sowie Wildtyp vor (siehe Abbildung 25).

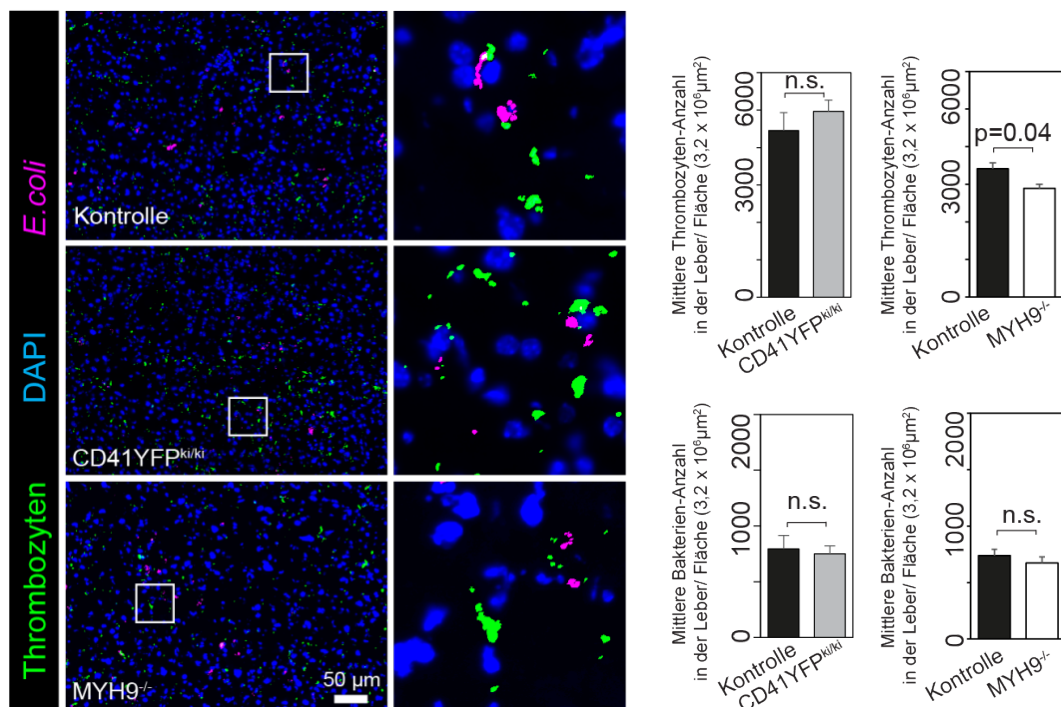


Abbildung 25: Anzahl von Thrombozyten und Bakterien zum 4h-Zeitpunkt

Links: Darstellung von repräsentativen immunhistologischen Schnitten der Leber zu dem 4h-Zeitpunkt nach Infektion mit *E. coli*. Thrombozyten (CD42b) = grün; *E. coli* (Anti-*E. coli* O&K-Antigen) = Magenta; DAPI = blau.

Rechts: Quantifizierung der Anzahl an Thrombozyten sowie Bakterien in den Gruppen anhand der Imaris-Software (Bitplane). Sowohl die Anzahl der Thrombozyten als auch die der Bakterien, weist nach 4h *post infectionem* keine großen Unterschiede in den Gruppen auf.

Signifikanz: * = p<0,05, n.s. = p>0,05; Fehlerbalken: +/- SD; (CD41YFP^{ki/ki} n = 4; MYH9^{-/-} n = 6)

4.6.2. Kolokalisationen zum 4h-Zeitpunkt

Wie oben beschrieben (Abbildung 24) konnte in den CD41YFP^{ki/ki}-Tieren ein Unterschied in den Aggregatgrößen der sich in Kolokalisation mit Thrombozyten befindlichen Bakterien festgestellt werden. Auch in den MYH9-defizienten Tieren konnte im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden, dass es zur Bindung von mehrheitlich kleineren aber weniger größeren (> 20µm) Aggregaten als im Wildtyp kommt. Die Frequenz der Bakterienaggregate mit einer Größe von mehr als 20 µm² ist in Tieren mit migrationsdefizienten Thrombozyten somit signifikant reduziert. Die Abfolge der auftretenden Größen der Bakterienaggregate ist mit einem p-Wert von 0,024 signifikant nicht zufällig (Wald-Wolfowitz-Sequenztest).

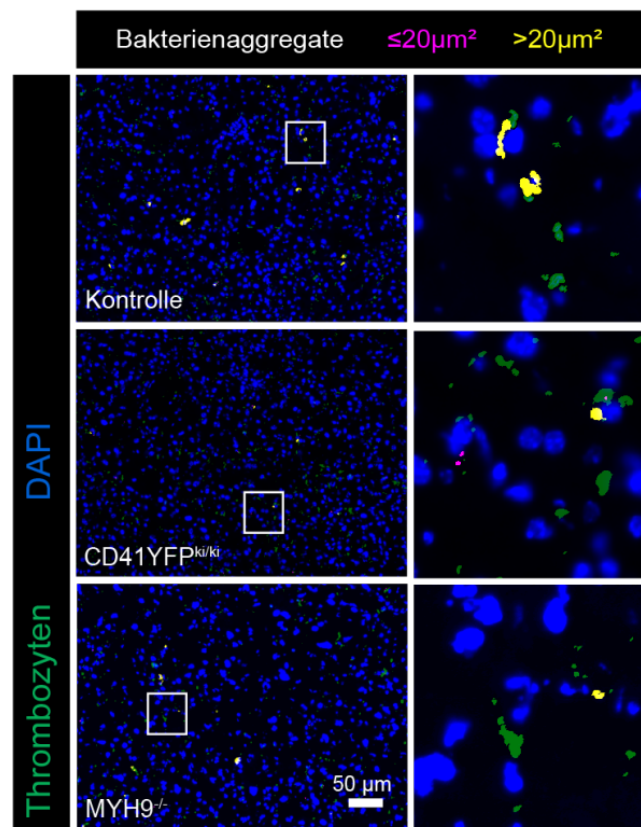


Abbildung 26: GröÙe der Bakterienaggregate in Kolokalisation mit Thrombozyten zum 4h-Zeitpunkt

Anhand der Imaris-Software (Bitplane) wurde die GröÙe der Bakterienaggregate, die sich in Kolokalisation mit Thrombozyten befindet ermittelt.

Darstellung der histologischen Schnitte in welchen Bakterien-Aggregate, die mit Thrombozyten kolokalisieren farblich kodiert sind – *E. coli*-Aggregate ≤ 20 µm² = magenta, *E. coli*-Aggregate ≥ 20 µm² = gelb; Thrombozyten sind in grün und Zellkerne in blau dargestellt.

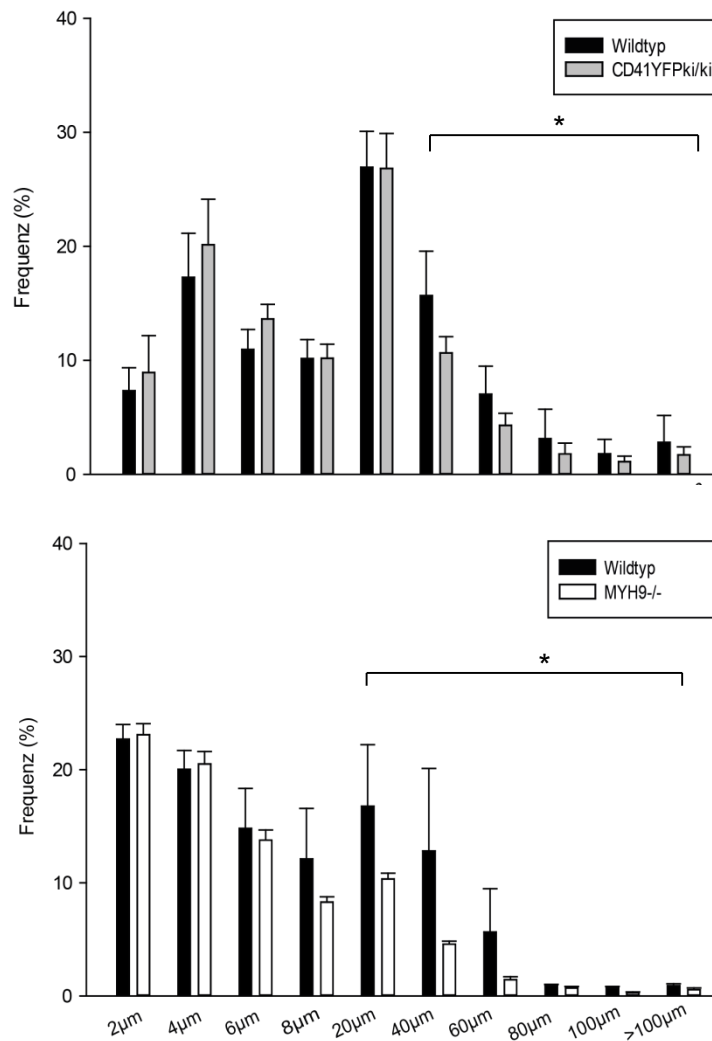


Abbildung 27: Größe der Bakterienaggregate in Kolokalisation mit Thrombozyten zum 4h-Zeitpunkt

Graphische Darstellung der Größenverteilung der Bakterienaggregate, die sich in Kolokalisation mit Thrombozyten befinden (ausgewertete Schnittfläche pro Präparat: $\sim 3,2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$).

Die Frequenz der Bakterienaggregate mit einer Größe von mehr als $20 \mu\text{m}^2$ ist in Tieren mit migrations-defizienten Thrombozyten signifikant reduziert ($p = <0,05$).

Die Abfolge der auftretenden Größen der Bakterienaggregate ist mit einem p-Wert von 0,024 signifikant nicht zufällig (Wald-Wolfowitz-Sequenztest). Fehlerbalken: \pm SD; (CD41YFPki/ki n = 4; MYH9-/- n = 6)

4.7. Klinisches Bild der Tiere

In dem angewandten Sepsis-Modell mit *E. coli* als Pathogen überlebten alle infizierten Tiere über einen Zeitraum von 24 h, wobei ein deutlich reduziertes Allgemeinbefinden unabhängig vom Genotyp nach 4 bis 6 Stunden beobachtet wurde. Dies äußerte sich in einem verminderten Allgemeinbefinden (verlangsamte Bewegung, gesträubtes Fell, gewölbter Rücken), Verhalten (Desinteresse an der Umgebung, Zurückgezogenheit)

reduzierter Futter- und Wasseraufnahme. Dieser Zustand verbesserte sich jedoch im Laufe der Zeit. 24 Stunden *post infectionem* hatten sich die Tiere sichtbar erholt, was sich in einem deutlich verbesserten Allgemeinzustand und einem weitgehend unauffälligen Allgemeinbefinden manifestierte. Ein klinischer Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte also nicht eindeutig anhand der engmaschig verlaufenden Adspektion der Tiere festgestellt werden.

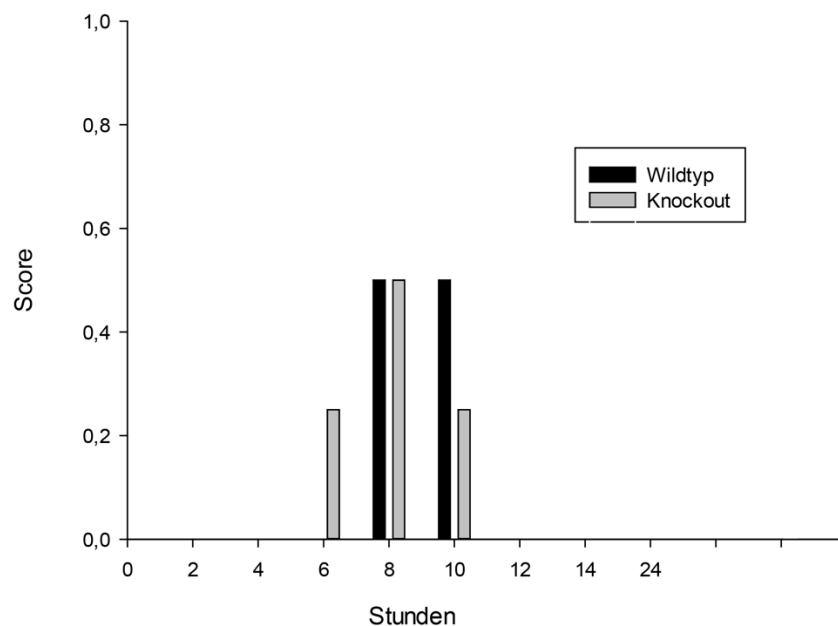


Abbildung 28: Score-Bewertung im 24h-Versuch

Die mit *E. coli* infizierten Tiere wurden anhand eines Score Sheets (siehe Abbildung 5) engmaschig überwacht. Nach 6 bis 10 Stunden verschlechterte der Zustand der Tiere, der sich jedoch über die nächsten Stunden wieder verbesserte.

4.8. Untersuchung der Zytokine und Leberenzyme

Wie in der klinischen Untersuchung zeigte sich auch in den untersuchten Plasma-Proben eine nur geringe Manifestation einer Sepsis. Dazu wurde das Zytokin IL-6 sowie die Leberenzyme AST und ALT im Plasma analysiert.

Der gemessene Wert von IL-6 im Plasma von nichtinfizierten Kontrolltieren lag unter der Nachweisgrenze. Bei den infizierten Tieren zeigten sich eine nur geringgradige Erhöhungen der Werte und nur geringe Unterschiede

zwischen Knockout und Wildtyp. In Publikationen mit LPS-Injektionlagen die ebenfalls 4 h *post infectionem* gemessenen Werte deutlich über den von uns erhobenen Werten(150).

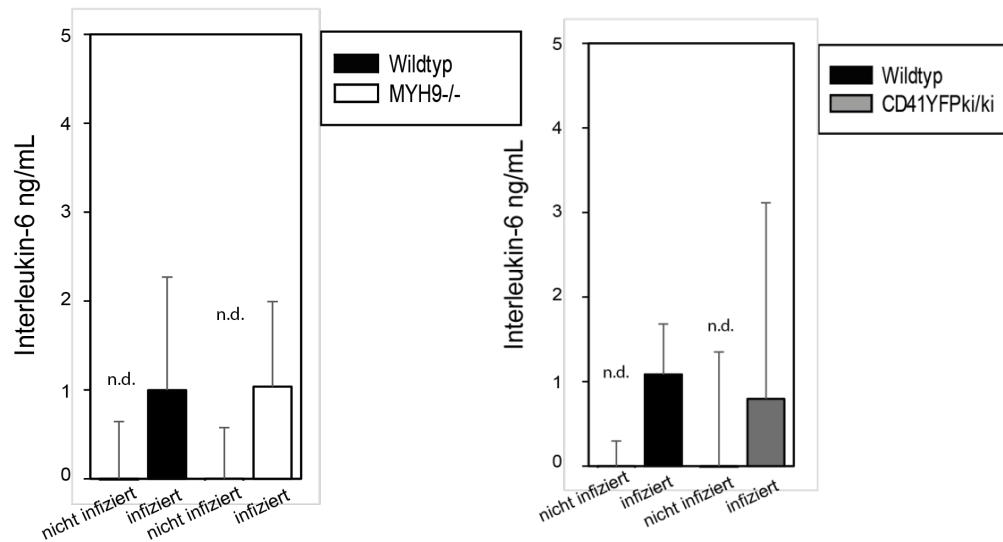


Abbildung 29: Interleukin-6 Messung (4 h post infectionem)

Die IL-6 Konzentrationen im Plasma wurden anhand eines Enzym-linked Immunosorbent Assays bestimmt.

Bei nichtinfizierten Tieren lagen die Werte unter der Nachweisgrenze (n.d.). Auch bei infizierten Tieren zeigte sich nur eine sehr geringe Erhöhung der Werte.

Fehlerbalken: \pm SD; n = 4

Die Transaminase AST befindet sich grundsätzlich intrazellulär, nur bei Zellschädigungen erscheint dieses Enzym im Plasma. Erhöhte Werte entstehen vor allem durch Leberschäden aber auch durch Hämolyse oder Herz- sowie Skelettmuskelschäden. Auch in nicht infizierten Tieren könnten Werte von AST detektiert werden. Dies kann durch eine Hämolyse bedingt sein, da sich AST auch in Erythrozyten befindet. Im Vergleich zu Werten nach mittels LPS induzierter Inflammation (150), zeigen die Tiere mit dem in unserem Modell infizierten *E. coli*-Substamm nur sehr geringe Erhöhungen der AST-Werte.

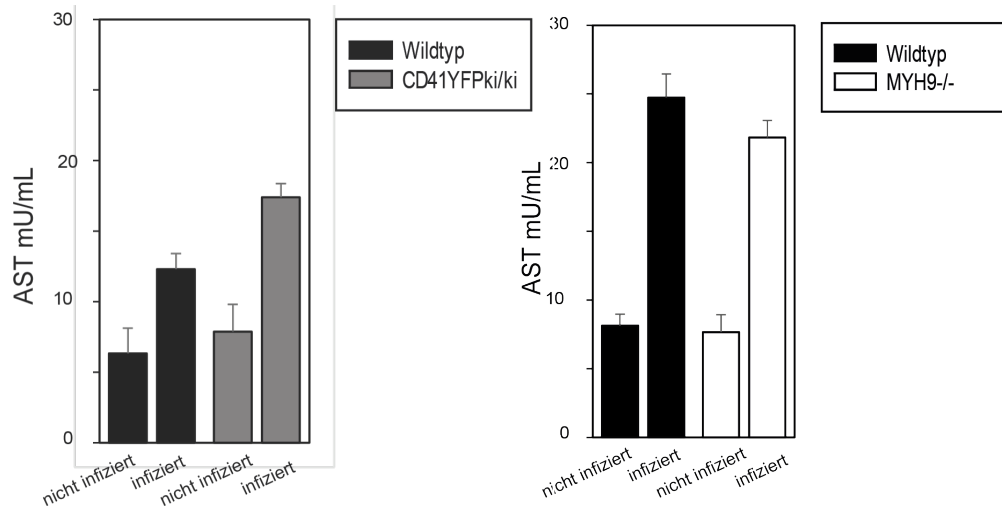


Abbildung 30: AST – Messung (4 h post infectionem)

Zur Messung der AST wurde ein kommerziell verfügbares Kit verwendet (siehe IV.7.4.3).

Es kam nur zu einer geringgradigen Erhöhung der AST-Werte im Rahmen der *E. coli*-Sepsis. Der Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout war nur gering.

Fehlerbalken: +/- SD; n=4

ALT befindet sich im Zytoplasma und die höchste Konzentration tritt in der Leber auf, weshalb sie auch zur Bestimmung von Leberparenchymschäden eingesetzt wird. Geringe Erhöhungen können auch bei Schädigung von Niere, Herz, Skelettmuskel, Pankreas, Milz und im Lungengewebe auftreten. Im Vergleich zu Infektionen durch LPS (150) bzw. *B. cereus* (10) infizierten Mäusen lösen die mit dem in unserem Modell verwendeten *E. coli* eine nur geringe Erhöhung der Werte aus.

Es konnte somit kein manifestierter Leberschaden in den Tieren nachgewiesen werden.

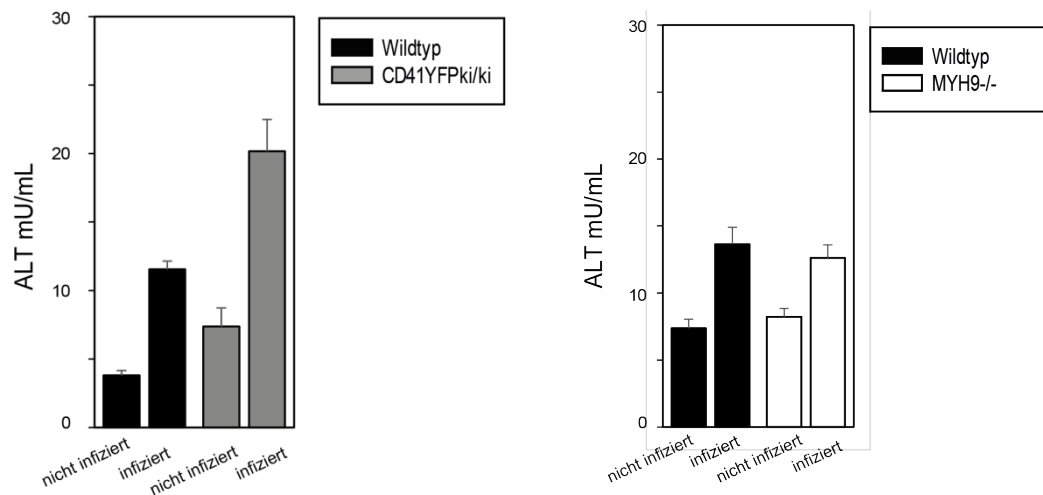


Abbildung 31: ALT – Messung(4h post infectionem)

Zur Messung der Alaninaminotransferase wurde ein kommerziell verfügbares Kit verwendet (siehe IV.7.4.3).

Es kam nur zu einer geringgradigen Erhöhung der ALT-Werte im Rahmen der *E. coli*-Sepsis.

Fehlerbalken: +/- SD; n = 4

VI. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die Migration der Thrombozyten *in vivo* mittels live Imaging darzustellen und Aufschlüsse über die physiologische *in vivo* Relevanz zu erhalten. Der erste Teil dieser Arbeit bestand darin, ein geeignetes Modell für die Darstellung der Thrombozytenmigration mittels live Imaging zu finden und zu etablieren.

In vitro konnte die eigenständige Migration der Thrombozyten bereits umfassend dargestellt werden (99). So wurde von Gärtner F. et al. Die Migration der Thrombozyten auf Fibrin(ogen)-beschichteten-Oberflächen gezeigt (99). Wir stellten deshalb die Hypothese auf, dass Thrombozyten Fibrin(ogen) auch *in vivo* als Plattform nutzen, um durch Migration eigenständig ihren Standort zu wechseln und Wirkungsorte zu erreichen beziehungsweise eigenständig ihre Interaktion untereinander und mit anderen Komponenten zu optimieren. Dazu war es wichtig, ein geeignetes *in vivo*-Modell zu finden, in dem es zu Ablagerung von Fibrin(ogen) kommt.

Erste Erfolge in der Darstellung des Prozesses der Thrombozytenmigration *in vivo* konnte Florian Gärtner mittels 2 Photonen-Mikroskopie im Rahmen der Hämostase erzielen. Wie von Gärtner F. et al. Beschrieben, konnten Thrombozyten in den Randbereichen eines wachsenden Thrombus im Ohrmodell beim Vorgang der Migration dargestellt werden (99). Dabei wurde jedoch die Deposition von Fibrin(ogen) in den Bereichen, in denen die Migration der einzelnen Thrombozyten stattfand, nicht untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es nun, die Wanderung der Thrombozyten zusätzlich in der unmittelbaren Umgebung von Fibrin(ogen)ablagerungen zu untersuchen. Wie in den oben genannten Vorarbeiten, wurde das Ohrmodell beibehalten, um den Prozess der Migration im Rahmen der Hämostase, bei der es zur Bildung von Fibrin(ogen) kommt, genauer zu verfolgen. Das Ohrmodell ist gut etabliert und gilt gegenüber Bewegungsartefakten als sehr stabil (139). Mittels einer Nadel konnte eine mechanische Verletzung der Mikrozirkulation gesetzt werden. Dadurch wurde die Bildung eines Thrombus induziert. Es konnte die Entstehung

sowie Umbauvorgänge des Thrombus verfolgt werden. Außerdem konnte Fibrin(ogen) in den Randbereichen des Thrombus und vor allem im Bereich der Gefäßwand dargestellt werden. Um eine Fehlinterpretation von migrierenden Thrombozyten, bedingt durch das passive Mitführen gebundener Thrombozyten durch wandernde Leukozyten im Bereich des Thrombus, auszuschließen, wurde eine antikörpervermittelte Depletion der Leukozyten durchgeführt, beziehungsweise wurden diese durch Anfärben mittels fluoreszierender Farbstoffe kenntlich gemacht. Aufgrund der nicht standardisiert durchführbaren mechanischen Induktion der Gefäßverletzung variierte das Ausmaß der Verletzung und somit die Bildung des Thrombus stark. Es konnte die Migration von Leukozyten beobachtet werden (V.1, Abbildung 10), das Phänomen der Migration von einzelnen migrierenden Thrombozyten konnte jedoch nicht dargestellt werden. Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch mit den Daten unserer Arbeitsgruppe, bei denen gezeigt werden konnte, dass ein geringer Anteil an Thrombozyten im Randbereich des Thrombus migriert (99). Wenige Zellen (<1 %) bewegten sich mit relativ niedriger Geschwindigkeit auch entgegen des Blutflusses, wodurch auch *in vivo* gezeigt werden konnte, dass es sich um einen autonomen und aktiven Vorgang handelt (99). Diese Gegebenheiten lassen darauf schließen, dass die Migration in den Randbereichen eines Thrombus zwar in Erscheinung tritt, jedoch nur ein sehr selten zu beobachtendes Phänomen ist. Somit spielt sie wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle in der akuten Hämostase und Ausbildung eines Thrombus.

Dies könnte mehrere Gründe haben. Zum einen ist die Migration, wie bereits gezeigt, ein sehr seltenes Ereignis in diesem Modell. Zum anderen könnten migrierende Thrombozyten aufgrund ihrer kleinen Größe und der durch das Färbeprotokoll schlechten Differenzierbarkeit übersehen worden sein. Zudem könnten durch die geringe Größe der Zellen und der eingeschränkten mikroskopischen Auflösung kurze zurückgelegte Distanzen verloren gegangen sein. Hinzu kommt, dass der Versuchsaufbau keine einheitliche Verletzung erlaubt. Demzufolge war eine Migration auf Fibrin(ogen) in diesem Modell nicht darstellbar. Aus diesem Grund wurde der Fokus auf ein anderes Modell gelegt.

Die wichtigste und auch am besten erforschte Rolle der Thrombozyten ist die der Hämostase und Thrombus-Formation. Das Einsatzgebiet der Thrombozyten beschränkt sich jedoch keinesfalls ausschließlich auf diesen Bereich. Bereits in der Embryogenese (4) aber auch in Tumorgenese (5) sowie Metastasierung (6) spielen Thrombozyten eine Rolle. Mehr und mehr Erkenntnisse lassen sie als wichtige Komponente in den Fokus der Inflammation und Immunantwort rücken (7, 8, 58, 108, 109). Thrombozyten gelten mittlerweile als wichtige Komponente in der Inflammation, allerdings wurde die Relevanz der Thrombozyten-Migration in dem Prozess der Inflammation noch nie untersucht. Es konnte bereits von Massberg S. et al. Gezeigt werden, dass es im Rahmen der Inflammation zu Ablagerungen von Fibrin(ogen) kommt (37, 110). Unabhängig von ihrer Funktion in der Hämostase, könnte die Fähigkeit zur Migration von Thrombozyten gerade auf dem Gebiet der Inflammation eine wichtige Rolle spielen.

Um eine Relevanz der Thrombozytenmigration *in vivo* innerhalb inflammatorischer Prozesse zu untersuchen, wurde das Cremastermodell als bereits gut etabliertes Entzündungs-Modell gewählt. Erstes Ziel dabei war es, eine Ablagerung von Fibrin(ogen) im Rahmen der Inflammation sowie die Rekrutierung von Thrombozyten nachzuweisen. Die intraskrotale Injektion von LPS induzierte eine ausreichende Inflamationsreaktion im Gewebe. Es kam zur Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten innerhalb der Mikrozirkulation des *M. cremasters*. Auch wurden Interaktionen zwischen Thrombozyten und Fibrin(ogen) verfolgt. Mehrere Thrombozyten sammelten sich an Fibrin(ogen)oberflächen. Das Fibrin(ogen) lagerte sich jedoch nicht wie angenommen an dem Gefäßendothel des entzündeten Gewebes ab, sondern akkumulierte vermehrt an einzelnen Leukozyten. Die Interaktion der Thrombozyten mit dem Fibrin(ogen) fand jedoch nur über einige Minuten (< 8 Minuten) statt. In dieser Zeit war es nicht möglich, Migration von Thrombozyten zu beobachten.

Wie bereits erwähnt spielen Thrombozyten eine wichtige Rolle in der Inflammation. So sind vielfältige Interaktionen von Thrombozyten mit Bakterien bereits bekannt (57-65), welche sie zusätzlich mehr und mehr

als wichtige Komponenten in den Blickpunkt der Immunologie rücken lassen. Es ist bekannt, dass Thrombozyten mit Bakterien interagieren und unter anderem bakterizide Funktionen (11) sowie Phagozytose-ähnliche Fähigkeiten (75) besitzen. Zudem unterstützen sie andere Zellen, wie Makrophagen und Leukozyten, im Prozess der Clearance von Bakterien (9, 10). Jedoch wurde nie eine Relevanz der Migration von Thrombozyten in diesem Zusammenhang gezeigt.

Um die Interaktion von Thrombozyten und Bakterien *in vivo* zu untersuchen, wurde ebenfalls das Cremastermodell herangezogen. Es wurde ebenso eine Inflammation durch die Gabe von LPS induziert und anschließend inaktivierte und daher nicht-pathogene *E. coli*-Partikel intravenös verabreicht. Es konnten Interaktionen von Thrombozyten mit *E. coli*-Partikeln dargestellt werden. Jedoch eignet sich die Mikrozirkulation des Cremaster-Muskels nicht als optimales Modell um unsere Fragestellung zu untersuchen. Zwar kam es zu Ansammlungen von *E. coli*-Partikeln in der Vaskularisation des vorab durch LPS-Gabe entzündeten Gewebes und es wurden auch Leukozyten und Thrombozyten rekrutiert, jedoch ist der Cremaster-Muskel nicht als relevant für die Clearance von Pathogenen anzusehen.

Das gewählte Cremastermodell ist technisch sehr gut für Einzelzell-Aufnahmen geeignet. Aufgrund der Tatsache, dass es jedoch nicht zu stabilen Fibrin(ogen)-Ablagerungen in der Mikrozirkulation kommt und somit die Voraussetzung für die Migration von Thrombozyten nicht gegeben ist, stellt es nicht das geeignete Modell für unsere Fragestellung dar.

Einen großen Stellenwert in der Inflammation erlangt die Leber, die als wichtiges Organ in der Immunabwehr gilt (107, 112). Neben den spezialisierten Kupffer-Zellen und auch Leukozyten, wurde eine Beteiligung von Thrombozyten in der Clearance von Pathogenen bereits in Arbeiten in *in vivo*-Experimenten gezeigt (9, 10). Außerdem wurde bereits beschrieben, dass es im Rahmen der Sepsis (bedingt durch *E. coli*) zu Ansammlung von Fibrin innerhalb der Mikrovaskularisation der Leber (Sinusoide) kommt (110).

Nachdem es, entsprechend der oben genannten Erkenntnisse, im Rahmen einer Sepsis zur Rekrutierung von Fibrin(ogen) als auch Thrombozyten in der Mikrozirkulation der Leber kommt, wurde die Leber als zentrales Organ gewählt, um die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Bakterien näher zu untersuchen.

Zunächst wurde die Interaktion von Thrombozyten und Bakterien im Lebermodell durch 2-Photonen-Mikroskopie untersucht. Zwar konnte in Einzelbildern die Interaktion von Bakterien und Thrombozyten innerhalb der Lebersinusoiden dargestellt werden, jedoch waren die Voraussetzungen für eine ausreichend stabile Präparation für Langzeitaufnahmen in der Mikrozirkulation der Leber zu diesem Zeitpunkt nicht gegeben. Dennoch konnte mit den Daten gezeigt werden, dass mit der gelungenen Darstellung von Fibrin(ogen), Bakterien und Thrombozyten die Voraussetzungen gegeben wären, um den Vorgang der Thrombozytenmigration und gegebenenfalls Interaktionen von Thrombozyten und Bakterien darzustellen. Die Verwendung einer besser geeigneten Stage (Fixierungs-Vorrichtung) zur Fixierung der Leber sowie der Einsatz eines invertierten Objektivs, wie aus anderen Arbeiten bekannt (10), würden durch das direkte Aufliegen der Leber des sich in ventraler Lage befindlichen Tieres auf der Stage und das sich ventral des Organs befindlichen Objektivs stabilere Aufnahmen erlauben sowie weniger Druck auf das Organ bewirken und somit einen ungestörten Blutfluss ermöglichen. Diese beiden aufgeführten Punkte könnten zu einer maßgeblichen Verbesserung des Modells beitragen und optimale Voraussetzungen für Aufnahmen an diesem Organ mit sich bringen.

Nachdem die Live-Visualisierung der Thrombozytenmigration nicht direkt möglich war, wurde eine neue Strategie gewählt um unserer Fragestellung nachzugehen. Dazu wurden histologische Schnitte septischer Lebern von Wildtyp-Tieren und Tieren mit defekter Thrombozytenmigration verglichen und in Hinblick auf Unterschiede in der Thrombozyten-Bakterien-Interaktion untersucht.

Zu Beginn unserer *in vivo* – Versuche wurde eine Zeitreihe mit den CD41YFP^{ki/ki}-Tieren erstellt. Aufgrund des nicht-funktionsfähigen Integrins ($\alpha\text{IIb}\beta 3$) sind Thrombozyten des CD41YFP^{ki/ki}-Stammes nicht in der Lage

an Fibrin(ogen) zu binden und *in vitro* an einer Fibrin(ogen) Oberfläche adhären zu werden beziehungsweise sich auszubreiten („Spreading“) und somit zu migrieren (99). Außerdem liegt bei Thrombozyten dieser Linie ein Aggregationsdefizit vor. Aufgrund der Tatsache, dass einige Bakterien zur Aggregation von Thrombozyten führen (10), wurden vorab Aggregometrie-Versuche durchgeführt. Der verwendete *E. coli*-Substamm förderte jedoch keine Aggregation der Thrombozyten (Abbildung 32). Daher ist ein Aggregationsdefizit seitens der Thrombozyten von CD41YFP^{ki/ki}-Tieren für die Interaktion mit den Bakterien zu vernachlässigen. Außerdem konnten dadurch unsere *in vivo*-Daten bestätigt werden, bei denen eher Adhärenz einzelner bis weniger Thrombozyten zu beobachten ist.

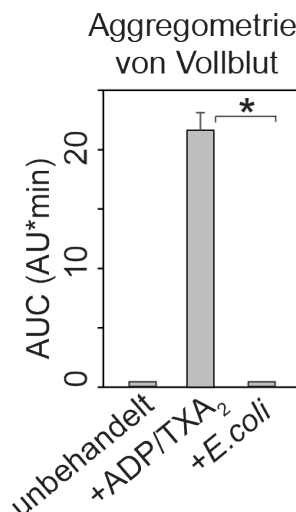


Abbildung 32: Aggregometrie von Vollblut

Das entnommene Vollblut wurde mit und ohne Zugabe von *E. coli* inkubiert und anschließend die Aggregation der Thrombozyten mittels Aggregometer gemessen. Die Aktivierung der Thrombozyten mittels ADP und TXA₂ (U46619) wurde als Positivkontrolle verwendet.

Wilcox-Test; Signifikanz: * = $p < 0,05$; Fehlerbalken: \pm SD; $n = 4$

Mit freundlicher Genehmigung von Florian Gärtner, Institutsarbeit (Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern, AG Massberg), unpublizierte Daten

Zur Induktion der Sepsis wurden den Tieren intravenös $3,2 \times 10^8$ CFU *E. coli* injiziert. Nach bestimmten Zeitpunkten (1 h, 4 h, 12 h, und 24 h) wurde den Tieren intrakardial Blut entnommen und die Organe zur Anfertigung der histologischen Schnitte bzw. CFUs entnommen.

Wie bereits erwähnt wurde von unserer Arbeitsgruppe in früheren Arbeiten gezeigt, dass es im Rahmen einer *E. coli*-Sepsis zu Ablagerungen von Fibrin innerhalb der Sinusoide kommt (110). Diese Untersuchungen wurden 6 h *post infectionem* gemacht. Um zu untersuchen, ob es auch zu früheren (1 h, 4 h) beziehungsweise späteren (12 h, 24 h) Zeitpunkten zu Ablagerungen von Fibrin(ogen) kommt, wurde dieses mittels immunhistologischer Fibrin(ogen)-Färbung in den Schnitten sichtbar gemacht. So konnten wir zeigen, dass es im Verlauf der akuten Sepsis zu einer zunehmenden Fibrin(ogen)-Ablagerungen mit einem Maximum nach 12 Stunden kommt.

Anhand der Auszählung der CFUs zu Beginn der Versuchsreihe des Sepsis-Modells konnten wir sehen, dass nach sechs Stunden nur noch wenige Bakterien im Blut zirkulieren. Im Gegensatz hierzu kam es zu einer Anreicherung der Bakterien in der Leber. Um zu überprüfen, ob auch Thrombozyten in die Leber rekrutiert wurden, wurden Kryo-Schnitte der Leber zu den verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 4 h, 12 h, 24 h) angefertigt und immunhistologisch angefärbt. Hierbei wurden Wildtyptiere gegenüber migrationsdefizienten CD41YFP^{ki/ki}-Tieren verglichen. Zum 1 h- Zeitpunkt war die Anzahl der Thrombozyten im Wildtyp gegenüber der CD41YFP^{ki/ki}-Tiere erhöht. Das lässt einen Vorteil des Wildtyp gegenüber dem Knockout vermuten, welcher durch eine bessere Bindung an das bereits vorhandene Fibrin(ogen) zustande kommen könnte. Nach vier Stunden *post infectionem* ist jedoch die höchste Anzahl an Thrombozyten in den Sinusoiden erreicht, wobei die Anzahl der rekrutierten Thrombozyten im Wildtyp und Knockout nun annähernd gleich ist. Dies zeigt, dass die Rekrutierung zu diesem Zeitpunkt nicht CD41 abhängig ist und andere Mechanismen hierfür zuständig sind. So konnte die Gruppe um Paul Kubes zum Beispiel zeigen, dass der GPIIb-Komplex eine entscheidende Bedeutung in der Rekrutierung von Thrombozyten in die Leber hat (10).

Die Gesamtzahl der Bakterienaggregate in den untersuchten Schnitten war in Wildtyp und Knockout nahezu gleich, jedoch zeigte sich ein Unterschied in der eingenommenen Gesamtfläche der Bakterien, welche im Wildtyp größer war als im Knockout. Aufgrund nebeneinanderliegender Bakterien, die wegen der limitierenden Auflösung des Mikroskops als ein

Bakterium erkannt und gezählt werden, ist die Messung der Fläche der Bakterien um Bakterienmengen abzuschätzen als aussagekräftiger anzusehen.

Es zeigte sich in den histologischen Schnitten, dass sowohl im Wildtyp als auch im Knockout Thrombozyten mit Bakterien-Aggregaten in unmittelbarem Kontakt standen. Jedoch war die Frequenz der Thrombozyten, die sich in Kolo-kalisation mit Bakterienaggregaten mit einer Größe von mehr als $20\text{ }\mu\text{m}^2$ befanden, in den Knockout Tieren niedriger. Das heißt migrationsfähige Thrombozyten der Wildtyp-tiere waren effektiver in der Bündelung von Bakterien und konnten mehr große Bakterienaggregate binden.

Diese Ergebnisse sind mit den parallel gewonnenen *in vitro* Daten übereinstimmend (Persönliche Mitteilung: Florian Gärtner, Institutsarbeit (Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern, AG Massberg), unpublizierte Daten). Auf einer mit Fibrin(ogen)-beschichteten Oberfläche migrierende Thrombozyten nehmen gleichzeitig mit dem Fibrin(ogen) Bakterien auf und bündeln dieses an ihrer Oberfläche. Dabei werden Bakterien-Bündel, bestehend aus zwei bis drei oder mehr Bakterien gebildet. Die vorherrschende mittlere Fläche der gebildeten Bündel liegt bei $20\text{-}40\text{ }\mu\text{m}^2$. Migrationsdefiziente Thrombozyten sind zwar fähig Bakterien zu binden, jedoch sind sie aufgrund ihres Migrationsdefekts signifikant uneffektiver in der Bündelung von Bakterien. Auch hier zeigte sich, dass migrationsfähige Thrombozyten signifikant größere Bakterien-Aggregate mit einer Größe von mehr als $20\text{ }\mu\text{m}^2$ während der Migration auf mit Bakterien infizierten Fibrin(ogen)oberflächen bilden konnten. So konnte *in vitro* (Abbildung 33). als ein effektives Aufsammeln und Bündeln von Bakterien durch migrierende Thrombozyten gezeigt werden. Der Migration der einzelnen Thrombozyten könnte in diesem Prozess somit eine weitaus größere Bedeutung zukommen als in anderen Funktionsgebieten wie der Hämostase und Thrombusformation.

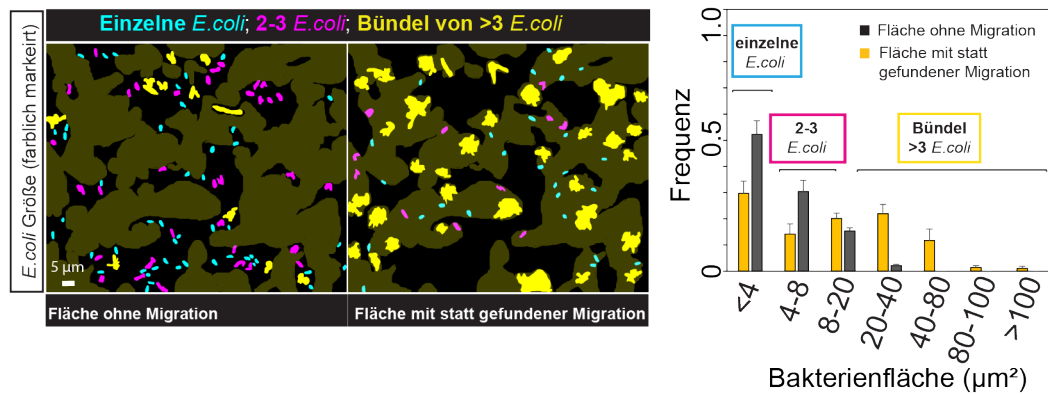


Abbildung 33: *In vitro*-migrierende Thrombozyten bündeln Bakterien

(Links) Thrombozyten migrierten *in vitro* auf einer mit Alexa Fluor 488 konjugierten Fibrin(ogen)-Oberfläche, welche zuvor mit *E. coli* inkubiert wurde. Aufgrund des verbleibenden Fluoreszenz-Signals wurde die gesamte Fläche anschließend in eine Fläche, auf der keine Migration stattgefunden hat (schwarz) und eine, auf der Thrombozyten migrierten (gelb – Fibrin(ogen)-frei), unterteilt. In der Auswertung wurde die Bakterienfarblich nach ihrer Größe kodiert. Einzelne Bakterien = blau; 2 bis 3 Bakterien = magenta; Bündel von > 3 Bakterien = gelb.

Links: im linken Bild sind die Bakterien auf der Fläche, in welcher keine Migration stattgefunden hat farblich kodiert. Im rechten Bild sind die Bakterien der Fläche dargestellt, in der Thrombozyten migriert sind. Hier sind deutlich größere Bündel von 3 oder mehr Bakterien mit einer Größe von durchschnittlich 20-40 µm² zu sehen.

Rechts: Darstellung der Größenverteilung der *E. coli*-Aggregate (Fläche in µm²) in den unterteilten Flächen (Migration stattgefunden, keine Migration). Große Bündel von mehr als 3 Bakterien mit einer Größe von 20-40 µm² überragen in der Fläche, in welcher Thrombozyten migriert sind.

Wilcoxon-Test; Fehlerbalken: +/- SD

Mit freundlicher Genehmigung von Florian Gärtner, Institutsarbeit (Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern, AG Massberg), unpublizierte Daten

Um zu überprüfen, ob es sich bei der effektiveren Bündelung der migrationsfähigen Thrombozyten tatsächlich um einen Migrations-abhängigen Effekt handelte, wurde als zweites Modell die MYH9^{-/-}-Linie hinzugezogen. Thrombozyten dieser Linie weisen *in vitro* auf einer Fibrin(ogen)-Oberfläche eine normale Adhäsion und Spreading auf, zeigen jedoch aufgrund des Fehlens des Myosins im Zytoskelett einen noch spezifischeren Thrombozytenmigrationsdefekt. Interessanterweise konnte hier der gleiche Effekt beobachtet werden. Auch hier zeigte sich, dass Thrombozyten des Wildtyps im Vergleich zum Knockout mit mehr größeren Bakterien-Aggregaten (>20 µm) in Kolokalisation stand und somit effektiver in der Bündelung der Bakterien war als der Knockout mit migrationsdefizienten Thrombozyten. Dieses Ergebnis unterstreicht zusätzlich, dass es sich um einen Migrations-abhängigen Unterschied

handelt und möglicherweise die Thrombozyten dazu befähigt, die Bakterien an einer Dissemination zu hindern.

So wurde bereits gezeigt, dass die Interaktion von Thrombozyten mit Bakterien in der Leber eine Dissemination der Pathogene verringert (10). Thrombozyten werden während einer durch *E. coli* verursachten Sepsis in die Lebersinusoiden rekrutiert und könnten dort durch die Migration, welche die Interaktion mit Bakterien fördert, dazu beitragen, die Dissemination von Bakterien zu verhindern. Die Fähigkeit zur Fortbewegung der Thrombozyten könnte sie somit in ihren anderen bekannten Fähigkeiten wie in der Bekämpfung von Pathogenen (7, 8, 11) in der Interaktion mit Bakterien effizienter sein lassen und sie somit in ihrer Rolle als vollentwickelte Immunzellen unterstützen.

Nun stellt sich die Frage was mit den Bündeln an Thrombozyten und Bakterien geschieht. Es ist bekannt, dass Thrombozyten eine bakterizide Wirkung besitzen (11) und so direkt die Bakterien vernichten könnten. Es wurde aber auch gezeigt, dass Thrombozyten andere Immunzellen bei ihrer Funktion unterstützen. So könnten sie durch das effektive Bündeln der Bakterien andere professionelle Zellen wie Makrophagen (10) und Leukozyten (9, 119) in der Abwehr und Clearance der Pathogene unterstützen und deren Invasion ins Gewebe und somit deren Ausbreitung und Schädigung des Körpers infolgedessen verhindern.

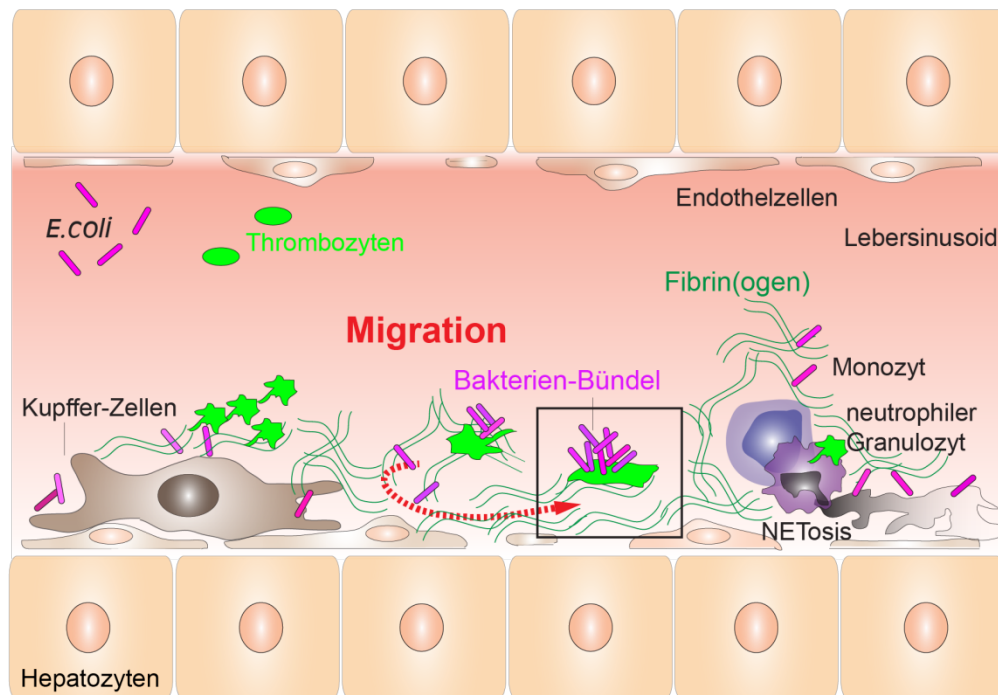


Abbildung 34: Graphische Darstellung der Hypothese der *in vivo* Thrombozyten-Migration

Thrombozyten werden im Rahmen der *E. coli*-Sepsis in die Lebersinusoid rekrutiert. Durch Migration sammeln Thrombozyten die in Fibrin(ogen)-gefängenen Bakterien auf und vermögen diese zu bündeln. Damit unterstützen sie spezialisierte Zellen wie Kupfer-Zellen und Leukozyten in der Abwehr und Clearance der Pathogene und verhindern deren Invasion ins Gewebe und somit deren Ausbreitung und Schädigung.

Mit freundlicher Genehmigung von Florian Gärtner, Institutsarbeit (Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern, AG Massberg), unpublierte Daten

Mit dieser Arbeit konnte ein Beitrag zur Aufklärung des Vorkommens der Migration von Thrombozyten und deren *in vivo* Relevanz geleistet werden.

Zwar gelang keine direkte Darstellung der Migration von Thrombozyten mittels intravital-mikroskopischer live Aufnahmen im Rahmen der akuten Hämostase (Ohrmodell) sowie im Inflammationsmodell (Cremastermodell, Lebermodell), jedoch gelang durch den Einsatz von thrombozytenmigrationsdefizienten Mauslinien ein indirekter Nachweis der *in vivo* Relevanz der Migration von Thrombozyten im Rahmen eines pathophysiologischen Prozesses. Als eine wichtige Beteiligung der Thrombozyten-Migration im Rahmen einer durch *E. coli* bedingten Sepsis konnte die Bündelung von Bakterien innerhalb der Lebersinusoid in septischen Mäusen aufgezeigt werden, wodurch sie möglicherweise die Bakterien in der Mikrozirkulation der Leber zurück halten und dadurch eine

wichtige Rolle als angeborene Immunzellen einnehmen.

Die Fähigkeit der Thrombozyten zu migrieren ist eine bislang noch wenig charakterisierte Funktion. Thrombozyten weisen eine vielseitige Beteiligung an verschiedenen, sowohl physiologischen (Embryogenese, Hämostase) als auch pathologischen Prozessen (Thrombose, Tumorgenese, Metastasierung, Immunantwort) auf. Gerade aufgrund ihrer vielseitigen Beteiligung an verschiedenen Prozessen könnte die Migration der Thrombozyten nicht nur in der Abwehr von Pathogenen von Bedeutung sein sondern auch in vielen anderen Prozessen von Relevanz sein. Ein genaues Verständnis des Mechanismus der Thrombozytenmigration könnte daher auf den verschiedenen Gebieten, wie der Immunantwort, eine neue Möglichkeit zur Intervention und Angriff für neue Therapiemöglichkeiten bieten.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Neben ihrer äußerst wichtigen und detailliert erforschten Rolle im Prozess der Hämostase und Thrombose im adulten Organismus (1-3), spielen Thrombozyten schon bei der Entstehung des Lebens, in der Embryogenese, eine bedeutende Rolle (4).

Auch in pathologischen Prozessen wie der Tumorgenese (6) und Metastasierung (5) spielen sie eine Rolle und ihr Einsatzgebiet reicht weit darüber hinaus. So erlangen sie mehr und mehr Aufmerksamkeit hinsichtlich ihrer wichtigen Funktion im Rahmen der Immunantwort (3, 7-11).

Zwar wurden Thrombozyten bereits als Zellen mit potentieller Fähigkeit zur Migration dargestellt (14-19), jedoch blieb der zugrundeliegende biologische Mechanismus des Migrationsprozesses der Thrombozyten bisher ungeklärt. Auch die Frage der Rolle sowie Relevanz der Thrombozytenmigration im lebenden Organismus blieb unerforscht.

Die Leber gilt als Hauptorgan in der Clearance von Bakterien. Es wurde gezeigt, dass es im Rahmen der bakteriellen Sepsis zur Ablagerung von Fibrin(ogen) innerhalb der Sinusoide kommt (110). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten in diesen Prozess involviert sind, jedoch wurde die Rolle der Thrombozytenmigration in diesem Zusammenhang nie adressiert (10, 110).

In vitro vermögen adhärente Thrombozyten anhand ihres $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -Rezeptors Fibrin(ogen) zu binden und anhand ihres Actomyosinskeletts können sie den Widerstand des Substrats überwinden, wodurch sie die Fähigkeit haben zu polarisieren und zu migrieren. Von Bedeutung dabei ist die Aufnahme der an das Fibrin(ogen) gebundenen Bakterien. Dabei können sie mehrere Bakterien binden und diese in Bakterienaggregaten mit einer durchschnittlichen Größe von $20 - 40 \mu\text{m}^2$ bündeln (Mit freundlicher Genehmigung von Florian Gärtner, Institutsarbeit (Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern, AG Massberg), unpublizierte Daten).

In einem in dieser Arbeit verwendeten Sepsis-Modell konnte *in vivo* anhand zweier Mauslinien mit Migrationsdefekt der Thrombozyten (CD41YFP^{ki/ki} (funktionelle α IIb β 3-Integrin-KO) und Pf4CrexMYH9^{fl/fl}-Chimären) gezeigt werden, dass die Migration der Thrombozyten und die damit einhergehende Aufnahme der an das Fibrin(ogen) gebundenen Bakterien maßgebend zu einer effizienten Zurückhaltung der Bakterien innerhalb der Lebersinusoiden beiträgt.

So wurde gezeigt, dass in Mäusen mit migrationsfähigen Thrombozyten deutlich größere Aggregate an Bakterien gebunden werden können. Übereinstimmend mit bereits erhobenen *in vitro*-Daten aus der Arbeitsgruppe, wurden signifikant weniger Bakterien-Bündel mit einer Größe von mehr als 20 μm^2 in Mäusen mit Thrombozyten-Migrationsdefekt detektiert, als in Mäusen mit migrationsfähigen Thrombozyten. Dies lässt erkennen, dass die Migration von Thrombozyten die Bündelung der Bakterien unterstützt und damit die Effizienz der bakteriellen Clearance im Rahmen einer Infektion erhöhen.

VIII. SUMMARY

From early on in life platelets play an important role in mammalian physiology, e.g. during embryonic development (4). However, their most important and best studied role in the adult is their essential role as a cellular part in hemostasis and thrombus-formation (1-3).

Further research has shown that platelets play a key role in pathologic processes, such as tumorigenesis (6). In addition, they gain more and more attention for their important role during immune response (3, 7-11).

Platelets have been speculated to be migratory cells (14-16). However, the biological mechanisms underlying platelet migration remains unknown and the question of whether platelet migration occurs within the living organism has yet not been addressed.

The liver has been shown to be a key organ required for efficient clearance of circulating bacteria, that is supported by deposition of plasma fibrin(ogen) within the liver sinusoids. Also Platelets have been shown to be involved in the process of clearing pathogens (10, 110). However the role of platelet migration in this context has never been investigated.

In vitro, platelets bind and adhere to fibrin(ogen) via the $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -receptor. Furthermore, they possess the ability to polarize and to migrate on immobilized fibrin(ogen) (99). While migrating they pull on fibrin(ogen) thereby removing it from the substrate and ultimately accumulating it at their surface. Importantly, bacteria trapped within the fibrin(ogen) are collected at the same time, leading to platelet-bound bacterial bundles with an average size of 20 – 40 μm^2 (Florian Gärtner, unpublished data of the institute (Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern, AG Massberg)).

In this work two mouse strains with impaired migration of platelets (CD41YFP^{ki/ki} (functional $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -integrin-KO) und Pf4CrexMYH9^{fl/fl}-BM-chimeras) were used in a sepsis model. The results indicate that migration of platelets and the simultaneous collection of fibrin(ogen)-trapped bacteria serves as an relevant mechanism in restraining pathogens within the liver sinusoids.

Correspondingly, significantly less bacteria bundles with a diameter of more than $20\text{ }\mu\text{m}^2$ were detected in mice with impaired platelet migration, compared to wildtype mice. This is consistent with our previous *in vitro* data.

These findings indicate that platelet migration supports the efficiency of bacteria clearance at sites of infection.

IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria (lat.)	g	Erdschwerebeschleunigung
Abb.	Abbildung		
ADP	Adenosindiphosphat	g	Gramm
AF	Alexa Fluor	GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Arp 2/3	Actin related protein (Aktin ähnliches Protein)	GP	Glykoprotein
		h	Stunde
ATP	Adenosintriphosphat	i.p.	intraperitoneal
a.u.c	Area under the curve	i.v.	intravenös
BM	Basalmembran	IL	Interleukin
BSA	bovines Serumalbumin	IVC	individually ventilated cages
bzw.	Beziehungsweise		
°C	Grad Celsius	IVM	Intravital- Mikroskopie
ca.	zirka	kg	Kilogramm
Ca ²⁺	Kalzium	KO	Knockout
CD	Cluster of Differentiation	LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
CFU	Colony Forming Unit	LPS	Lipopolysaccharid
CLEC	C-typ Lektin Rezeptor	<i>M.</i>	<i>Musculus</i> (lat.)
cm	Zentimeter	mg	Milligramm
DNA	Desoxyribonukleinsäure	min	Minuten
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	ml	Milliliter
Fa.	Firma	MLCK	Myosin Light Chain Kinase
FOV	Field of view (Sichtfeld)	mM	millimolar

MPS	Mononukleäres Phagozytose System	Syk	Spleen Tyrosin Kinase
MW	Mittelwert	TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- alpha
MYH9	Myosin heavy chain 9	TXA ₂	Thromboxan
NaCl	Natriumchlorid	V.	<i>Vena</i> (lat.)
NETs	Neutrophile extrazelluläre traps	vWF	Von-Willebrand-Faktor
n.d.	Engl.= not detectable ; unter der Nachweisgrenze	WT	Wildtyp
nm	Nanometer	YFP	Yellow Fluorescent Proteine
OCS	Open Canicular System	z. B.	zum Beispiel
PBS	Phosphate Buffered Saline	μ g	Mikrogramm
PE	Phycoerythrin	μ L	Mikroliter
Pf4	Platelet-factor 4	μ M	Mikromolar
PFA	Paraformaldehyd	μ m	Mikrometer
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- Aktivität		
PRP	Thrombozyten- reiches- Plasma (platelets rich plasma)		
RANTES	Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted		
ROCK	Rho-Kinase		
s	Sekunde		

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verdünnungen der auf Agar-Platten ausgestrichenen Organe bzw. Blut.....	49
Tabelle 2: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper in der Doppelfärbung Thrombozyten/Bakterien.....	56
Tabelle 3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper in der Doppelfärbung Thrombozyten/Fibrin(ogen)	57
Tabelle 4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper in der Doppelfärbung Fibrin(ogen)/Bakterien	58

XI. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Hämostase	12
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Zell-Migration	18
Abbildung 3:	Migrierender Thrombozyt.....	20
Abbildung 4:	Migrierender Thrombozyt auf Fibrin(ogen)-Oberfläche.....	22
Abbildung 5:	Score Sheet	46
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des Sepsis-Modells	47
Abbildung 7:	Immunhistologische Färbungen der Leber	59
Abbildung 8:	Darstellung der Kolokalisation von Thrombozyten- und Bakterienaggregaten.....	60
Abbildung 9:	Thrombus in der Mikrozirkulation des Ohrs	62
Abbildung 10:	Randbereich eines Thrombus in der Mikrozirkulation des Ohrs	62
Abbildung 11:	Interaktion von Thrombozyten mit Fibrin(ogen) in der Mikrozirkulation des M.cremaster	64
Abbildung 12:	Interaktion von Thrombozyten mit E. coli-Partikel in der Mikrozirkulation des M. cremaster	65
Abbildung 13:	Mikrozirkulation der Leber.....	67
Abbildung 14:	Darstellung der kombinierten Fluoreszenzen im Lebermodell	68
Abbildung 15:	Anzahl der Colony Forming Units (CFUs).....	69
Abbildung 16:	Fibrin(ogen) Verteilung im Zeitverlauf.....	70
Abbildung 17:	Fibrin(ogen)-Deposition in den Sinusoiden.....	71
Abbildung 18:	Thrombozyten-Messung im Vollblut.....	72
Abbildung 19:	Quantitative Analyse der Anzahl und Fläche der Thrombozyten in immunhistologischen Schnitten der Leber	73
Abbildung 20:	Thrombozyten-Regionen zum 4 h-Zeitpunkt.....	74
Abbildung 22:	Bakterienaggregate.....	75
Abbildung 23:	Mittelwert der Fläche der Bakterienaggregate	76
Abbildung 25:	Kolokalisationen von Thrombozyten mit Bakterien	78
Abbildung 26:	Frequenz (%) der Größen der Bakterienaggregate in Kolokalisation	79

Abbildung 27:	Anzahl von Thrombozyten und Bakterien zum 4h-Zeitpunkt	81
Abbildung 28:	Größe der Bakterienaggregate in Kolokalisation mit Thrombozyten zum 4h-Zeitpunkt	82
Abbildung 29:	Größe der Bakterienaggregate in Kolokalisation mit Thrombozyten zum 4h-Zeitpunkt	83
Abbildung 30:	Score-Bewertung im 24h-Versuch	84
Abbildung 31:	Interleukin-6 Messung (4 h post infectionem)	85
Abbildung 32:	AST – Messung (4 h post infectionem)	86
Abbildung 33:	ALT – Messung(4h post infectionem)	87
Abbildung 33:	Aggregometrie von Vollblut	93
Abbildung 34:	In vitro-migrierende Thrombozyten bündeln Bakterien	96
Abbildung 34:	Graphische Darstellung der Hypothese der in vivo Thrombozyten-Migration	98

XII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Jackson, S.P. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nature medicine* 17, 1423-1436 (2011).
2. Brewer, D.B. Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *British journal of haematology* 133, 251-258 (2006).
3. Engelmann, B., Massberg, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 34-45 (2013).
4. Finney, B.A., Schweighoffer, E., Navarro-Nunez, L., Benezech, C., Barone, F., Hughes, C.E., Langan, S.A., Lowe, K.L., Pollitt, A.Y., Mourao-Sa, D., Sheardown, S., Nash, G.B., Smithers, N., Reis e Sousa, C., Tybulewicz, V.L., Watson, S.P. CLEC-2 and Syk in the megakaryocytic/platelet lineage are essential for development. *Blood* 119, 1747-1756 (2012).
5. Haemmerle, M., Bottsford-Miller, J., Pradeep, S., Taylor, M.L., Choi, H.J., Hansen, J.M., Dalton, H.J., Stone, R.L., Cho, M.S., Nick, A.M., Nagaraja, A.S., Gutschner, T., Gharpure, K.M., Mangala, L.S., Rupaimoole, R., Han, H.D., Zand, B., Armaiz-Pena, G.N., Wu, S.Y., Pecot, C.V., Burns, A.R., Lopez-Berestein, G., Afshar-Kharghan, V., Sood, A.K. FAK regulates platelet extravasation and tumor growth after antiangiogenic therapy withdrawal. *The Journal of clinical investigation* 126, 1885-1896 (2016).
6. Gay, L.J., Felding-Habermann, B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nature reviews Cancer* 11, 123-134 (2011).
7. Semple, J.W., Italiano, J.E., Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 11, 264-274 (2011).
8. Semple, J.W., Freedman, J. Platelets and innate immunity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67, 499-511 (2010).
9. McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B.G., Jenne, C.N., Kubes, P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell host & microbe* 12, 324-333 (2012).

10. Wong, C.H., Jenne, C.N., Petri, B., Chrobok, N.L., Kubes, P. Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nature immunology* 14, 785-792 (2013).
11. Yeaman, M.R. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nature reviews Microbiology* 12, 426-437 (2014).
12. Semple, J.W., Italiano, J.E., Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nature Reviews Immunology* 11, 264-274 (2011).
13. Bettex-Galland, M., Luescher, E.F. Extraction of an actomyosin-like protein from human thrombocytes. *Nature* 184(Suppl 5), 276-277 (1959).
14. Lowenhaupt, R.W., Glueck, H.I., Miller, M.A., Kline, D.L. Factors which influence blood platelet migration. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 90, 37-45 (1977).
15. Kraemer, B.F., Borst, O., Gehring, E.M., Schoenberger, T., Urban, B., Ninci, E., Seizer, P., Schmidt, C., Bigalke, B., Koch, M., Martinovic, I., Daub, K., Merz, T., Schwanitz, L., Stellos, K., Fiesel, F., Schaller, M., Lang, F., Gawaz, M., Lindemann, S. PI3 kinase-dependent stimulation of platelet migration by stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 88, 1277-1288 (2010).
16. Schmidt, E.M., Munzer, P., Borst, O., Kraemer, B.F., Schmid, E., Urban, B., Lindemann, S., Ruth, P., Gawaz, M., Lang, F. Ion channels in the regulation of platelet migration. *Biochemical and biophysical research communications* 415, 54-60 (2011).
17. Nathan, P. The migration of human platelets in vitro. *Thrombosis et diathesis haemorrhagica* 30, 173-177 (1973).
18. Valone, F.H., Austen, K.F., Goetzl, E.J. Modulation of the random migration of human platelets. *The Journal of clinical investigation* 54, 1100-1106 (1974).
19. Pitchford, S.C., Momi, S., Baglioni, S., Casali, L., Giannini, S., Rossi, R., Page, C.P., Gresele, P. Allergen induces the migration of

- platelets to lung tissue in allergic asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 177, 604-612 (2008).
20. Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D.D., Graf, T., Italiano, J.E., Jr., Shivdasani, R.A., von Andrian, U.H. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science (New York, NY)* 317, 1767-1770 (2007).
 21. Battinelli, E.M., Hartwig, J.H., Italiano, J.E., Jr. Delivering new insight into the biology of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Current opinion in hematology* 14, 419-426 (2007).
 22. Kaushansky, K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *The Journal of clinical investigation* 115, 3339-3347 (2005).
 23. Kaushansky, K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *The New England journal of medicine* 354, 2034-2045 (2006).
 24. Weyrich, A.S., Schwertz, H., Kraiss, L.W., Zimmerman, G.A. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7, 241-246 (2009).
 25. Pan, L., Zhao, Y., Yuan, Z., Qin, G. Research advances on structure and biological functions of integrins. *SpringerPlus* 5, 1094 (2016).
 26. Du, X., Ginsberg, M.H. Integrin alpha IIb beta 3 and platelet function. *Thrombosis and haemostasis* 78, 96-100 (1997).
 27. Nurden, A.T. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet journal of rare diseases* 1, 10 (2006).
 28. George, J.N., Caen, J.P., Nurden, A.T. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood* 75, 1383-1395 (1990).
 29. Boudreaux, M.K., Lipscomb, D.L. Clinical, biochemical, and molecular aspects of Glanzmann's thrombasthenia in humans and dogs. *Veterinary pathology* 38, 249-260 (2001).

30. Boudreaux, M.K., Kvam, K., Dillon, A.R., Bourne, C., Scott, M., Schwartz, K.A., Toivio-Kinnucan, M. Type I Glanzmann's thrombasthenia in a Great Pyrenees dog. *Veterinary pathology* 33, 503-511 (1996).
31. Haysom, L.Z., Kennerly, R.M., Muller, R.D., Smith-Carr, S., Christopherson, P.W., Boudreaux, M.K. Identification and Characterization of Glanzmann Thrombasthenia in 2 Closely Related Mixed-breed Dogs. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 30, 642-646 (2016).
32. Christopherson, P.W., Insalaco, T.A., van Santen, V.L., Livesey, L., Bourne, C., Boudreaux, M.K. Characterization of the cDNA Encoding α IIb and β 3 in normal horses and two horses with Glanzmann thrombasthenia. *Veterinary pathology* 43, 78-82 (2006).
33. Gawaz, M. *Blood platelets* Thieme Verlag (2001).
34. Blair, P., Flaumenhaft, R. Platelet α -granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews* 23, 177-189 (2009).
35. Rendu, F., Brohard-Bohn, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 12, 261-273 (2001).
36. Radomski, M.W., Palmer, R.M., Moncada, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* (London, England) 2, 1057-1058 (1987).
37. Massberg, S., Enders, G., Matos, F.C., Tomic, L.I., Leiderer, R., Eisenmenger, S., Messmer, K., Krombach, F. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 94, 3829-3838 (1999).
38. Furie, B., Furie, B.C. In vivo thrombus formation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 5 Suppl 1, 12-17 (2007).
39. Kroll, M.H., Hellums, J.D., McIntire, L.V., Schafer, A.I., Moake, J.L. Platelets and shear stress. *Blood* 88, 1525-1541 (1996).

40. Savage, B., Saldivar, E., Ruggeri, Z.M. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 84, 289-297 (1996).
41. Storey, R.F., Sanderson, H.M., White, A.E., May, J.A., Cameron, K.E., Heptinstall, S. The central role of the P(2T) receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity. *British journal of haematology* 110, 925-934 (2000).
42. Andrews, R.K., Berndt, M.C. Platelet physiology and thrombosis. *Thrombosis research* 114, 447-453 (2004).
43. Furie, B., Furie, B.C. Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine* 359, 938-949 (2008).
44. Kulkarni, S., Dopheide, S.M., Yap, C.L., Ravanat, C., Freund, M., Mangin, P., Heel, K.A., Street, A., Harper, I.S., Lanza, F., Jackson, S.P. A revised model of platelet aggregation. *The Journal of clinical investigation* 105, 783-791 (2000).
45. Ono, A., Westein, E., Hsiao, S., Nesbitt, W.S., Hamilton, J.R., Schoenwaelder, S.M., Jackson, S.P. Identification of a fibrin-independent platelet contractile mechanism regulating primary hemostasis and thrombus growth. *Blood* 112, 90-99 (2008).
46. Chou, J., Mackman, N., Merrill-Skoloff, G., Pedersen, B., Furie, B.C., Furie, B. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* 104, 3190-3197 (2004).
47. Ross, R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *American heart journal* 138, S419-420 (1999).
48. Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241 (2000).
49. Massberg, S., Brand, K., Gruner, S., Page, S., Muller, E., Muller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., Konrad, I., Nieswandt, B., Gawaz, M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of experimental medicine* 196, 887-896 (2002).

50. Lindemann, S., Tolley, N.D., Dixon, D.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Weyrich, A.S. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *The Journal of cell biology* 154, 485-490 (2001).
51. McEver, R.P. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thrombosis and haemostasis* 86, 746-756 (2001).
52. Henn, V., Slupsky, J.R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G., Kroczeck, R.A. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391, 591-594 (1998).
53. Massberg, S., Vogt, F., Dickfeld, T., Brand, K., Page, S., Gawaz, M. Activated platelets trigger an inflammatory response and enhance migration of aortic smooth muscle cells. *Thrombosis research* 110, 187-194 (2003).
54. Gawaz, M., Neumann, F.J., Schomig, A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy. *Circulation* 99, E1-e11 (1999).
55. Siess, W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiological reviews* 69, 58-178 (1989).
56. Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Stafforini, D.M. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Critical care medicine* 30, S294-301 (2002).
57. Wachowicz, B., Saluk, J., Kaca, W. Response of blood platelets to *Proteus mirabilis* lipopolysaccharide. *Microbiology and immunology* 42, 47-49 (1998).
58. Andonegui, G., Kerfoot, S.M., McNagny, K., Ebbert, K.V., Patel, K.D., Kubes, P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* 106, 2417-2423 (2005).
59. Stahl, A.L., Svensson, M., Morgelin, M., Svanborg, C., Tarr, P.I., Mooney, J.C., Watkins, S.L., Johnson, R., Karpman, D.

- Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic *Escherichia coli* binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. *Blood* 108, 167-176 (2006).
60. Shannon, O., Herten, E., Norrby-Teglund, A., Morgelin, M., Sjöbring, U., Björck, L. Severe streptococcal infection is associated with M protein-induced platelet activation and thrombus formation. *Molecular microbiology* 65, 1147-1157 (2007).
61. Plummer, C., Wu, H., Kerrigan, S.W., Meade, G., Cox, D., Ian Douglas, C.W. A serine-rich glycoprotein of *Streptococcus sanguis* mediates adhesion to platelets via GPIb. *British journal of haematology* 129, 101-109 (2005).
62. O'Seaghdha, M., van Schooten, C.J., Kerrigan, S.W., Emsley, J., Silverman, G.J., Cox, D., Lenting, P.J., Foster, T.J. *Staphylococcus aureus* protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *The FEBS journal* 273, 4831-4841 (2006).
63. Cognasse, F., Hamzeh-Cognasse, H., Chabert, A., Jackson, E., Arthaud, C.A., Garraud, O., McNicol, A. *Streptococcus sanguinis*-induced cytokine and matrix metalloproteinase-1 release from platelets. *BMC immunology* 15, 15 (2014).
64. Herzberg, M.C., Krishnan, L.K., MacFarlane, G.D. Involvement of alpha 2-adrenoreceptors and G proteins in the modulation of platelet secretion in response to *Streptococcus sanguis*. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 4, 435-442 (1993).
65. Brennan, M.P., Loughman, A., Devocelle, M., Arasu, S., Chubb, A.J., Foster, T.J., Cox, D. Elucidating the role of *Staphylococcus epidermidis* serine-aspartate repeat protein G in platelet activation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7, 1364-1372 (2009).
66. Duerschmied, D., Suidan, G.L., Demers, M., Herr, N., Carbo, C., Brill, A., Cifuni, S.M., Mauler, M., Cicko, S., Bader, M., Idzko, M., Bode, C., Wagner, D.D. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood* 121, 1008-1015 (2013).

67. Behnke, O. An electron microscope study of the megacaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *Journal of ultrastructure research* 24, 412-433 (1968).
68. Behnke, O. An electron microscope study of the rat megacaryocyte. II. Some aspects of platelet release and microtubules. *Journal of ultrastructure research* 26, 111-129 (1969).
69. Behnke, O. The morphology of blood platelet membrane systems. *Series haematologica* (1968) 3, 3-16 (1970).
70. White, J.G. A search for the platelet secretory pathway using electron dense tracers. *The American journal of pathology* 58, 31-49 (1970).
71. White, J.G. Electron microscopic studies of platelet secretion. *Progress in hemostasis and thrombosis* 2, 49-98 (1974).
72. Behnke, O. Electron microscopic observations on the membrane systems of the rat blood platelet. *The Anatomical record* 158, 121-137 (1967).
73. White, J.G. The transfer of thorium particles from plasma to platelets and platelet granules. *The American journal of pathology* 53, 567-575 (1968).
74. Quie, P.G., White, J.G., Holmes, B., Good, R.A. In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *The Journal of clinical investigation* 46, 668-679 (1967).
75. White, J.G. Platelets are coverocytes, not phagocytes: uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system. *Platelets* 16, 121-131 (2005).
76. Vicente-Manzanares, M., Webb, D.J., Horwitz, A.R. Cell migration at a glance. *J Cell Sci* 118, 4917-4919 (2005).
77. Suarez, S.S., Wu, M. Microfluidic devices for the study of sperm

migration. Molecular human reproduction, (2016).

78. Anifandis, G., Messini, C., Dafopoulos, K., Sotiriou, S., Messinis, I. Molecular and cellular mechanisms of sperm-oocyte interactions opinions relative to in vitro fertilization (IVF). International journal of molecular sciences 15, 12972-12997 (2014).
79. Montero, J.A., Heisenberg, C.P. Gastrulation dynamics: cells move into focus. Trends in cell biology 14, 620-627 (2004).
80. Keller, R. Cell migration during gastrulation. Current opinion in cell biology 17, 533-541 (2005).
81. Molyneaux, K., Wylie, C. Primordial germ cell migration. The International journal of developmental biology 48, 537-544 (2004).
82. Jones, N.C., Trainor, P.A. Role of morphogens in neural crest cell determination. Journal of neurobiology 64, 388-404 (2005).
83. Martin, P., Leibovich, S.J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. Trends in cell biology 15, 599-607 (2005).
84. Santoro, M.M., Gaudino, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. Experimental cell research 304, 274-286 (2005).
85. Luster, A.D., Alon, R., von Andrian, U.H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. Nature immunology 6, 1182-1190 (2005).
86. Schmitt, D., Andrews, J., Tan, M. Determination of Breast Cancer Cell Migratory Ability. Methods in molecular biology (Clifton, NJ) 1406, 171-180 (2016).
87. Friedl, P., Wolf, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. Nature reviews Cancer 3, 362-374 (2003).
88. Lauffenburger, D.A., Horwitz, A.F. Cell migration: a physically integrated molecular process. Cell 84, 359-369 (1996).

89. Pollard, T.D., Borisy, G.G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465 (2003).
90. Pollard, T.D., Cooper, J.A. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* (New York, NY) 326, 1208-1212 (2009).
91. Welch, M.D., Mullins, R.D. Cellular control of actin nucleation. *Annual review of cell and developmental biology* 18, 247-288 (2002).
92. Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., Horwitz, A.R. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* (New York, NY) 302, 1704-1709 (2003).
93. Lee, J., Ishihara, A., Oxford, G., Johnson, B., Jacobson, K. Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature* 400, 382-386 (1999).
94. Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., Horwitz, A.R. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 778-790 (2009).
95. Svitkina, T.M., Verkhovsky, A.B., McQuade, K.M., Borisy, G.G. Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *The Journal of cell biology* 139, 397-415 (1997).
96. Yang, S., Huang, X.Y. Ca^{2+} influx through L-type Ca^{2+} channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration. *The Journal of biological chemistry* 280, 27130-27137 (2005).
97. Ridley, A.J. Rho GTPase signalling in cell migration. *Current opinion in cell biology* 36, 103-112 (2015).
98. King, S.J., Asokan, S.B., Haynes, E.M., Zimmerman, S.P., Rotty, J.D., Alb, J.G., Jr., Tagliatela, A., Blake, D.R., Lebedeva, I.P., Marston, D., Johnson, H.E., Parsons, M., Sharpless, N.E., Kuhlman, B., Haugh, J.M., Bear, J.E. Lamellipodia are critical for

- haptotactic sensing and response. (2016).
99. Gärtner, F.R., Massberg, S., Engelhardt, S., Görlach, A., Busch, D. Autonomous Migration of Anucleated Platelets Facilitates Thrombus Consolidation. München: Universitätsbibliothek der TU München Dissertation 120 (2015).
 100. Keren, K., Pincus, Z., Allen, G.M., Barnhart, E.L., Marriott, G., Mogilner, A., Theriot, J.A. Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature* 453, 475-480 (2008).
 101. Varga-Szabo, D., Braun, A., Nieswandt, B. Calcium signaling in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7, 1057-1066 (2009).
 102. Leon, C., Eckly, A., Hechler, B., Aleil, B., Freund, M., Ravanat, C., Jourdain, M., Nonne, C., Weber, J., Tiedt, R., Gratacap, M.P., Severin, S., Cazenave, J.P., Lanza, F., Skoda, R., Gachet, C. Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood* 110, 3183-3191 (2007).
 103. Nourshargh, S., Hordijk, P.L., Sixt, M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 366-378 (2010).
 104. Nieswandt, B., Schulte, V., Zywiec, A., Gratacap, M.P., Offermanns, S. Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin α IIb β 3 activation in platelets. *The Journal of biological chemistry* 277, 39493-39498 (2002).
 105. Carter, S.B. Haptotaxis and the mechanism of cell motility. *Nature* 213, 256-260 (1967).
 106. Iskander, K.N., Osuchowski, M.F., Stearns-Kurosawa, D.J., Kurosawa, S., Stepien, D., Valentine, C., Remick, D.G. Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiological reviews* 93, 1247-1288 (2013).
 107. Hickey, M.J., Kubes, P. Intravascular immunity: the host-pathogen

- encounter in blood vessels. *Nat Rev Immunol* 9, 364-375 (2009).
108. Iannacone, M., Sitia, G., Isogawa, M., Marchese, P., Castro, M.G., Lowenstein, P.R., Chisari, F.V., Ruggeri, Z.M., Guidotti, L.G. Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage. *Nature medicine* 11, 1167-1169 (2005).
 109. Qu, Z., Chaikof, E.L. Interface between hemostasis and adaptive immunity. *Current opinion in immunology* 22, 634-642 (2010).
 110. Massberg, S., Grahl, L., von Bruehl, M.L., Manukyan, D., Pfeiler, S., Goosmann, C., Brinkmann, V., Lorenz, M., Bidzhekov, K., Khandagale, A.B., Konrad, I., Kennerknecht, E., Reges, K., Holdenrieder, S., Braun, S., Reinhardt, C., Spannagl, M., Preissner, K.T., Engelmann, B. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nature medicine* 16, 887-896 (2010).
 111. Dancygier, H. *Klinische Hepatologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*. Springer-Verlag 2013. p. 27-28.
 112. Crispe, I.N. The liver as a lymphoid organ. *Annual review of immunology* 27, 147-163 (2009).
 113. Lumsden, A.B., Henderson, J.M., Kutner, M.H. Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 8, 232-236 (1988).
 114. Catala, M., Anton, A., Portoles, M.T. Characterization of the simultaneous binding of *Escherichia coli* endotoxin to Kupffer and endothelial liver cells by flow cytometry. *Cytometry* 36, 123-130 (1999).
 115. Belaaouaj, A., McCarthy, R., Baumann, M., Gao, Z., Ley, T.J., Abraham, S.N., Shapiro, S.D. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nature medicine* 4, 615-618 (1998).
 116. Tkalcevic, J., Novelli, M., Phylactides, M., Iredale, J.P., Segal, A.W., Roes, J. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin

- in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity* 12, 201-210 (2000).
117. Segal, A.W. How neutrophils kill microbes. *Annual review of immunology* 23, 197-223 (2005).
118. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, NY)* 303, 1532-1535 (2004).
119. Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K.D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G.D., Keys, E.M., Allen-Vercoe, E., Devinney, R., Doig, C.J., Green, F.H., Kubes, P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature medicine* 13, 463-469 (2007).
120. Gupta, A.K., Joshi, M.B., Philippova, M., Erne, P., Hasler, P., Hahn, S., Resink, T.J. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS letters* 584, 3193-3197 (2010).
121. Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., Luo, L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis (New York, NY : 2000)* 45, 593-605 (2007).
122. Zhang, J., Varas, F., Stadtfeld, M., Heck, S., Faust, N., Graf, T. CD41-YFP mice allow in vivo labeling of megakaryocytic cells and reveal a subset of platelets hyperreactive to thrombin stimulation. *Experimental hematology* 35, 490-499 (2007).
123. von Bruhl, M.L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., Khandoga, A., Tirniceriu, A., Coletti, R., Kollnberger, M., Byrne, R.A., Laitinen, I., Walch, A., Brill, A., Pfeiler, S., Manukyan, D., Braun, S., Lange, P., Riegger, J., Ware, J., Eckart, A., Haidari, S., Rudelius, M., Schulz, C., Echtler, K., Brinkmann, V., Schwaiger, M., Preissner, K.T., Wagner, D.D., Mackman, N., Engelmann, B., Massberg, S. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *The Journal of experimental medicine* 209, 819-835 (2012).

124. Baker, D.G. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clinical microbiology reviews* 11, 231-266 (1998).
125. Frey, H.H., Löscher W., *Pharmakologie des zentralen Nervensystems (ZNS)* (Enke Verlag, Stuttgart, 2010).
126. Oheim, M., Michael, D.J., Geisbauer, M., Madsen, D., Chow, R.H. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Advanced drug delivery reviews* 58, 788-808 (2006).
127. Jameson, D.M., Croney, J.C., Moens, P.D. Fluorescence: basic concepts, practical aspects, and some anecdotes. *Methods in enzymology* 360, 1-43 (2003).
128. Ishikawa-Ankerhold, H.C., Ankerhold, R., Drummen, G.P. Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules (Basel, Switzerland)* 17, 4047-4132 (2012).
129. Heimstädt, O. Das Fluoreszenzmikroskop. *Z Wiss Mikrosk*, 28, 330–337 (1911).
130. P. Ellinger, A.H. Mikroskopische Untersuchung an lebenden Organen. I. Mitteilung. Methodik: Intravitalmikroskopie. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 90, 791-802 (1929).
131. Grzybowski, A., Pietrzak, K. Maria Goeppert-Mayer (1906-1972): two-photon effect on dermatology. *Clinics in dermatology* 31, 221-225 (2013).
132. Denk, W., Strickler, J.H., Webb, W.W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science (New York, NY)* 248, 73-76 (1990).
133. Helmchen, F., Denk, W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nature methods* 2, 932-940 (2005).
134. Drobizhev, M., Makarov, N.S., Tillo, S.E., Hughes, T.E., Rebane, A.

- Two-photon absorption properties of fluorescent proteins. *Nature methods* 8, 393-399 (2011).
135. Denk, W., Delaney, K.R., Gelperin, A., Kleinfeld, D., Strowbridge, B.W., Tank, D.W., Yuste, R. Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy. *Journal of neuroscience methods* 54, 151-162 (1994).
136. Svoboda, K., Yasuda, R. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron* 50, 823-839 (2006).
137. Ng, L.G., Hsu, A., Mandell, M.A., Roediger, B., Hoeller, C., Mrass, P., Iparraguirre, A., Cavanagh, L.L., Triccas, J.A., Beverley, S.M., Scott, P., Weninger, W. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS pathogens* 4, e1000222 (2008).
138. Roediger, B., Ng, L.G., Smith, A.L., Fazekas de St Groth, B., Weninger, W. Visualizing dendritic cell migration within the skin. *Histochemistry and cell biology* 130, 1131-1146 (2008).
139. Stark, K., Eckart, A., Haidari, S., Tirniceriu, A., Lorenz, M., von Bruhl, M.L., Gartner, F., Khandoga, A.G., Legate, K.R., Pless, R., Hepper, I., Lauber, K., Walzog, B., Massberg, S. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nature immunology* 14, 41-51 (2013).
140. Baez, S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvascular research* 5, 384-394 (1973).
141. Conway, R.S., Factor, S.M., Sonnenblick, E.H., Baez, S. Microvascular reactivity of the myopathic Syrian hamster cremaster muscle. *Cardiovascular research* 21, 796-803 (1987).
142. Rezek, P., Lauda, E. Leber und Gallenwege. In: Jaffe, R., editor. *Anatomie und Pathologie der Spontanerkrankungen der kleinen Laboratoriumstiere*. p. 105-.

143. Coons, A.H.C., H.J.; Jones, R.N. Immunological properties of antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Expt Biol Med* 47, 200–202 (1941).
144. Khandoga, A.G., Khandoga, A., Reichel, C.A., Bihari, P., Rehberg, M., Krombach, F. In vivo imaging and quantitative analysis of leukocyte directional migration and polarization in inflamed tissue. *PLoS One* 4, e4693 (2009).
145. Khandoga, A.G., Khandoga, A., Anders, H.J., Krombach, F. Postischemic vascular permeability requires both TLR-2 and TLR-4, but only TLR-2 mediates the transendothelial migration of leukocytes. *Shock (Augusta, Ga)* 31, 592-598 (2009).
146. Reichel, C.A., Khandoga, A., Anders, H.J., Schlondorff, D., Luckow, B., Krombach, F. Chemokine receptors Ccr1, Ccr2, and Ccr5 mediate neutrophil migration to postischemic tissue. *Journal of leukocyte biology* 79, 114-122 (2006).
147. Reichel, C.A., Rehberg, M., Bihari, P., Moser, C.M., Linder, S., Khandoga, A., Krombach, F. Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling. *Journal of leukocyte biology* 83, 864-874 (2008).
148. Reichel, C.A., Rehberg, M., Lerchenberger, M., Berberich, N., Bihari, P., Khandoga, A.G., Zahler, S., Krombach, F. Ccl2 and Ccl3 mediate neutrophil recruitment via induction of protein synthesis and generation of lipid mediators. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 1787-1793 (2009).
149. Aulakh, G.K., Balachandran, Y., Liu, L., Singh, B. Angiostatin inhibits activation and migration of neutrophils. *Cell and tissue research* 355, 375-396 (2014).
150. Xiang, B., Zhang, G., Guo, L., Li, X.A., Morris, A.J., Daugherty, A., Whiteheart, S.W., Smyth, S.S., Li, Z. Platelets protect from septic shock by inhibiting macrophage-dependent inflammation via the cyclooxygenase 1 signalling pathway. *Nature communications* 4, 2657 (2013).

XIII. DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg, für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, bedanken.

Herrn PD Dr. med. vet. Sven Reese danke ich für die Übernahme des Dissertationsvorhabens, die Durchsicht der Arbeit und deren Einreichung an der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Außerdem möchte ich mich für die große Unterstützung und Geduld bei der Auswertung der Statistik herzlich bedanken.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer PhD Dr. med. Florian Gärtner für die vielen Ratschläge und die Unterstützung bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit. Mit seinem fundierten Wissen stand er mir jederzeit konstruktiv zur Seite. Seine Ideen und Gedanken zu dem Thema setzten neue Impulse und trugen zum Gelingen dieser Arbeit bei. Durch sein Engagement und seinen Enthusiasmus hat er mir Freude am wissenschaftlichen Arbeiten vermittelt und mich für die Plättchen begeistert.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Massberg bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Kollegin Dr. med. vet. Meike Miller für die unermüdliche Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Mit ihrer positiven und motivierenden Art hat sie sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Großer Dank gilt auch Herrn Michael Lorenz für die unzähligen hilfreichen Ratschläge und das Teilen seines bemerkenswert umfangreichen Wissens. Zudem danke ich ihm für die große Unterstützung in der bakteriologischen Arbeit.

Bei Sven Stockhausen möchte ich mich für die fundierte Einarbeitung in die Immunhistologie und seine Unterstützung herzlich bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner lieben Freundin Kristin Bernhart für die Unterstützung bei dem Statistikprogramm.

Außerdem möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Christoph Reichel bedanken, insbesondere Bernd Uhl für die Einarbeitung in das Cremastermodell und die gute Zusammenarbeit bei den mikroskopischen Aufnahmen.